(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-525179
(P2007-525179A)
(43)公表日　平成19年9月6日(2007.9.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2B150
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B050
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B063
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A	4B064

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）　最終頁に続く

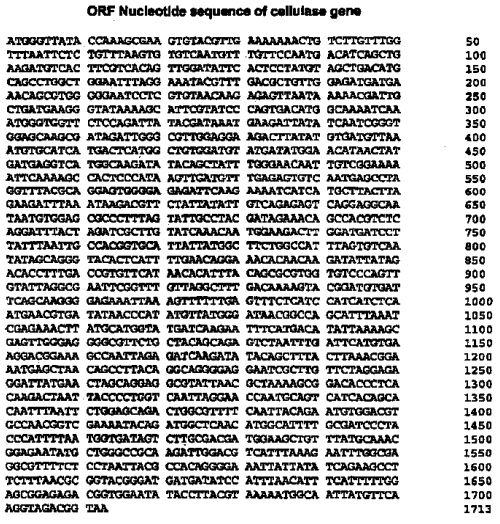
(21)出願番号　特願2006-513418 (P2006-513418)
(86)(22)出願日　平成16年4月28日 (2004.4.28)
(85)翻訳文提出日　平成17年12月2日 (2005.12.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/013175
(87)国際公開番号　WO2004/099369
(87)国際公開日　平成16年11月18日 (2004.11.18)
(31)優先権主張番号　60/467,255
(32)優先日　平成15年4月30日 (2003.4.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500284580
ジェネンコー・インターナショナル・インク
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　パロ・アルト、ページ・ミル・ロード　９２５
(74)代理人　100071010
弁理士　山崎　行造
(74)代理人　100121762
弁理士　杉山　直人
(74)代理人　100126767
弁理士　白銀　博
(74)代理人　100118647
弁理士　赤松　利昭
(74)代理人　100138519
弁理士　奥谷　雅子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規なバチルスＢａｇＣｅｌセルラーゼ

(57)【要約】
本発明は新規なセルラーゼ核酸配列、指定のＢａｇＣｅｌ、及び対応するＢａｇＣｅｌアミノ酸配列を提供する。また、本発明はＢａｇＣｅｌをエンコードする核酸配列を含む発現ベクター及び宿主細胞、組換えＢａｇＣｅｌタンパク質及びこれらを生成する方法を提供する。
【選択図】　図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下からなる群より選択される単離ポリヌクレオチド：
（ａ）配列番号１に示す配列に少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸配列、またはその相補体；
（ｂ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも８５％配列同一性を有するＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードする核酸配列、または当該配列に相補的な核酸配列；
（ｃ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９０％配列同一性を有するＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードする核酸配列、または当該配列に相補的な核酸配列；
（ｄ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９５％配列同一性を有するＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードする核酸配列、または当該配列に相補的な核酸配列；
（ｅ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列を有するＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードする核酸配列、または当該配列に相補的な核酸配列；
ここで、前記単離ポリヌクレオチドはセルラーゼ生物学的活性を有するポリペプチドをエンコードし、その同一性はＭａｃＶｅｃｔｏｒバージョン６．５のＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗプログラムにより測定され、オープンギャップ・ペナルティ１０．０、伸長ギャップ・ペナルティ０．１を含む初期設定パラメーター、及びＢＬＯＳＵＭ　３０類似マトリックスを用いて操作される。
【請求項２】
以下からなる群より選択される単離ポリヌクレオチド：
（ａ）配列番号１に示す核酸配列またはその相補体；
（ｂ）高ストリンジェンシーな条件下で配列番号１に示す配列にハイブリダイズする核酸配列、またはその相補体、またはその断片；
（ｃ）配列番号２に示す核酸配列またはその相補体；及び
（ｄ）高ストリンジェンシーな条件下で配列番号２に示す配列にハイブリダイズする核酸配列、またはその相補体、またはその断片；
ここで、前記単離ポリヌクレオチドはセルラーゼ生物学的活性を有するポリペプチドをエンコードし、ハイブリダイゼーションは５０％ホルムアミド、６Ｘ　ＳＳＣ、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、０．５％　ＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌ変性キャリアＤＮＡ中、４２℃で行われ、続いて２Ｘ　ＳＳＰＥ及び０．５％　ＳＤＳ中、室温で２回洗浄し、及びさらに０．１Ｘ　ＳＳＰＥ及び０．５％　ＳＤＳ中、４２℃で２回洗浄する。
【請求項３】
ヌクレオチドがｍＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ及びそれらのアンチセンス類似体からなる群より選択される、請求項１の単離ヌクレオチド。
【請求項４】
前記ポリヌクレオチドがＲＮＡ分子である、請求項３の単離ポリヌクレオチド。
【請求項５】
セルラーゼ活性を有する酵素をエンコードし、当該酵素がトリコデルマ源から単離される、請求項１の単離ポリヌクレオチド。
【請求項６】
酵素がトリコデルマ・リーゼイから単離される、請求項５の単離ポリヌクレオチド。
【請求項７】
セルラーゼ活性を有するアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築体であって、（ｉ）配列番号３に示すアミノ酸配列に少なくとも８５％同一性を有し、または（ｉｉ）中から高ストリンジェンシーな条件下、図２に示すヌクレオチド配列とハイブリダイズするように設計されたプローブにハイブリダイズでき、または（ｉｉｉ）配列番号３に示すアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列に少なくとも８５％配

列同一性を有するヌクレオチド配列に相補的である、ポリヌクレオチド配列を含む発現構築体であり、ここで当該同一性はＭａｃＶｅｃｔｏｒのバージョン６．５におけるＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗプログラムにより測定され、オープンギャップ・ペナルティ１０．０、伸長ギャップ・ペナルティ０．１を含む初期設定パラメーター、及びＢＬＯＳＵＭ　３０類似マトリックスを用いて操作される。

【請求項８】

請求項１のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項９】

ベクターにより形質転換された宿主細胞により認識される制御配列に動作可能に連結した、請求項１の単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項１０】

アクチノプラネス（Ａｃｔｉｎｏｐｌａｎｅｓ）のグルコースイソメラーゼ遺伝子由来プロモーター配列、ストレプトマイセスセルラーゼ遺伝子由来のシグナル配列、及びＢａｇＣｅｌセルラーゼをエンコードするポリヌクレオチド配列を含む調節ポリヌクレオチド配列を含む、請求項９に従う発現ベクター。

【請求項１１】

請求項８の発現構築体を含むベクター。

【請求項１２】

請求項８のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項１３】

原核細胞である、請求項１２の宿主細胞。

【請求項１４】

真核細胞である、請求項１２の宿主細胞。

【請求項１５】

セルラーゼ生物学的活性を有する実質的に精製されたＢａｇＣｅｌポリペプチドであって、以下からなる群より選択される配列を含む：

（ａ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列；

（ｂ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列；

（ｃ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列；

（ｄ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列；

（ｅ）配列番号３に示すアミノ酸配列の実質的に精製された生物学的に活性な断片；

ここで、当該同一性はＭａｃＶｅｃｔｏｒバージョン６．５のＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗプログラムにより測定され、オープンギャップ・ペナルティ１０．０、伸長ギャップ・ペナルティ０．１を含む初期設定パラメーター、及びＢＬＯＳＵＭ　３０類似マトリックスを用いて操作される。

【請求項１６】

バチルスから得られる、実質的に精製されたＢａｇＣｅｌセルラーゼポリペプチドまたは誘導体。

【請求項１７】

以下の工程を含むセルラーゼの生成方法：

（ａ）セルラーゼを生成する適当な条件下、適した培養基中で請求項１２に従う宿主細胞を培養する工程；

（ｂ）前記の生成したセルラーゼを得る工程。

【請求項１８】

宿主細胞が糸状菌または酵母細胞である、請求項１７の方法。

【請求項１９】

宿主細胞が細菌である、請求項１７の方法。

【請求項２０】
細菌がストレプトマイセスである、請求項１９の方法。
【請求項２１】
請求項１７の方法により調製したセルラーゼ活性を有する精製酵素。
【請求項２２】
ＢａｇＣｅｌ遺伝子内に欠失または挿入またはその他の変異を含み、当該遺伝子が不活性化され、ＢａｇＣｅｌポリペプチド生成が阻害された組換え宿主細胞。
【請求項２３】
配列番号３に示す配列を有するＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードするメッセンジャーＲＮＡに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、セルラーゼ生成宿主細胞に曝露すると、前記オリゴヌクレオチドは前記宿主細胞によるセルラーゼ生成を減少または阻害する、アンチセンスオリゴヌクレオチド。
【請求項２４】
宿主細胞が糸状菌である、請求項２３のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【請求項２５】
以下からなる群より選択されるポリペプチドを含む洗剤組成物：
（ａ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも８５％配列同一性を有するアミノ酸配列；
（ｂ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９０％配列同一性を有するアミノ酸配列；
（ｃ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸配列に少なくとも９５％配列同一性を有するアミノ酸配列；
（ｄ）図３（配列番号３）に示すアミノ酸；
（ｅ）配列番号３に示すアミノ酸配列の実質的に精製された生物学的に活性な断片；
ここで、当該同一性はＭａｃＶｅｃｔｏｒバージョン６．５のＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗプログラムにより測定され、オープンギャップ・ペナルティ１０．０、伸長ギャップ・ペナルティ０．１を含む初期設定パラメーター、及びＢＬＯＳＵＭ　３０類似マトリックスを用いて操作される。
【請求項２６】
界面活性剤及び請求項１５のセルラーゼを含む洗剤。
【請求項２７】
前記洗剤が洗濯用洗剤である、請求項２５の洗剤。
【請求項２８】
前記洗剤が食器用洗剤である、請求項２５の洗剤。
【請求項２９】
請求項１５のセルラーゼを含む飼料添加物。
【請求項３０】
木材パルプと請求項１５のセルラーゼとを接触させることを含む木材パルプの処理方法。
【請求項３１】
バイオマスと請求項１５のセルラーゼとを接触させることを含むバイオマスを糖に変換する方法。
【請求項３２】
さらに高フルクトース・コーンシロップの生成を含む、請求項３１の方法。
【請求項３３】
以下の工程を含むエタノールの生成方法：
（ａ）バイオマス組成物とＢａｇＣｅｌを含む酵素組成物とを接触させて糖溶液を得る工程；
（ｂ）前記糖溶液に発酵性微生物を加える工程；及び
（ｃ）エタノールを生成するために十分な条件下で発酵性微生物を培養する工程。
【請求項３４】

以下を含む新規な酵素を同定する方法：
（ａ）周囲環境から全微生物集団ＤＮＡを単離する工程；
（ｂ）大腸菌内にゲノムＤＮＡライブラリーを構築する工程；
（ｃ）セルラーゼ活性の発現に関してライブラリーをスクリーニングする工程；
（ｄ）セルラーゼ陽性クローン中のセルラーゼ遺伝子を同定する工程；及び
（ｅ）新規なセルラーゼ酵素をキャラクタライズする工程。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、ここにその全体を引用する、２００３年４月３０日に出願された米国仮出願６０／４６７，３１５号（代理人整理番号、ＧＣ７９７Ｐ）に基づく優先権を主張するものである。
【０００２】
連邦政府後援の研究開発の下、行われた発明の権利に関する声明
適用なし。
【０００３】
発明の分野
本発明はここでＢａｇＣｅｌとして言及する新規なセルラーゼに関する。また、セルラーゼをエンコードする核酸、前記セルラーゼを含む組成物、新規なセルラーゼを同定する方法、及び前記組成物を用いる方法についても記載する。好ましくは、当該セルラーゼはバチルス種から単離され、好ましくはＢ．ａｇａｒａｄｈａｅｒｅｎｓである。本発明はさらに、洗剤組成物、セルロース含有繊維処理、パルプ及び紙の処理、及び高フルクトース・コーンシロップまたはエタノールの生成用のデンプン処理に添加剤として、当業界で有利にセルラーゼが添加されるものとして認識される、新規なセルラーゼの組成物中での使用に関する。
【０００４】
発明の背景
セルロース及びヘミセルロースは光合成により最も豊富に生成される植物材料である。これらは高分子基材を単糖類に加水分解できる細胞外酵素を生成する多数の微生物、例えば細菌、酵母及び真菌によりエネルギー源として分解及び使用される（Ａｒｏ、他、２００１）。非再生源の限界が近づいているため、セルロースが主な再生可能エネルギー源となる可能性は非常に大きい（Ｋｒｉｓｈｎａ、他、２００１）。生物プロセスを通じたセルロースの効果的な活用は食料、飼料及び燃料不足の克服手段のひとつである（Ｏｈｍｉｙａ、他、１９９７）。
【０００５】
セルラーゼはセルロース（β－１，４－グルカンまたはβ－Ｄ－グルコシド結合）を加水分解してグルコース、セロビオース、セロオリゴ糖等の形成を生じる酵素である。セルラーゼは従来から３つの主な分類に分けられる：エンドグルカナーゼ（ＥＣ　３．２．１．４）（“ＥＧ”）、エキソグルカナーゼまたはセロビオヒドロラーゼ（ＥＣ　３．２．１．９１）（“ＣＢＨ”）、及びβ－グルコシダーゼ（［β］－Ｄ－グルコシドグルコヒドロラーゼ；ＥＣ　３．２．１．２１）（“ＢＧ”）（Ｋｎｏｗｌｅｓ、他、１９８７；Ｓｈｕｌｅｉｎ、１９８８）。エンドグルカナーゼは主にセルロース繊維のアモルファス部分で作用するのに対し、セロビオヒドロラーゼは結晶セルロースを分解することもできる（Ｎｅｖａｌａｉｎｅｎ　ａｎｄ　Ｐｅｎｔｔｉｌａ、１９９５）。従って、結晶セルロースを効果的に可溶化するために、セルラーゼ系中にセロビオヒドロラーゼの存在が必要である（Ｓｕｕｒｎａｋｋｉ、他、２０００）。β－グルコシダーゼはセロビース、セロ－オリゴ糖、及びその他のグルコシド由来Ｄ－グルコース単位の遊離に作用する（Ｆｒｅｅｒ、１９９３）。
【０００６】

結晶セルロースをグルコースに効果的に変換するためには、結晶セルロースの加水分解にあまり効果がない単離成分とともにＣＢＨ、ＥＧ及びＢＧの各分類由来の成分を含む完全なセルラーゼ系が必要である（Ｆｉｌｈｏ、他、１９９６）。それぞれの分類由来のセルラーゼ成分間で相乗関係が観測されている。特に、ＥＧ型セルラーゼ及びＣＢＨ型セルラーゼは相乗的に相互作用してより効果的にセルロースを分解する。例えば、Ｗｏｏｄ、１９８５を参照されたい。

【０００７】

従来からセルラーゼ組成物について記載されているが、家庭用洗剤、ストーンウォッシュ組成物または洗濯用洗剤等に使用するための新規で改善されたセルラーゼ組成物の必要性が依然としてある。改善された性能を示すセルラーゼは特に関心が高い。

【０００８】

発明の概要

本発明の目的は、洗剤、織物処理、バイオマス転換及びパルプ及び紙製造への使用に有益な性質を有する新規なセルラーゼを提供することである。

【０００９】

本発明の目的は、セルロース分解活性を有するポリペプチド及び当該ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを提供することである。当該ポリペプチドは細胞壁材料、例えばセルロース及び／またはヘミセルロースの分解を改善する。また、当該ポリペプチドは、例えばバイオマスなどの植物細胞壁材料の分解に関係するその他の酵素の安定性または活性も改善する。

【００１０】

本発明の目的は、新規なセルラーゼ及びその誘導体、当該セルラーゼを生成する方法、及びこのような新規なセルラーゼを含む組成物を提供することである。本発明はさらに、当業界でセルラーゼの添加が有利なものとして認識される、新規なセルラーゼ及びその誘導体の組成物中での使用に関し、例えば、洗剤組成物、有用なセルロース含有布及び繊維などの織物処理での添加剤としての使用、動物飼料添加物としての使用、バイオマス転換、パルプ及び紙の処理及び高フルクトース・コーンシロップまたはエタノールの生成用のデンプン処理への添加剤としての使用である。

【００１１】

本発明のさらなる目的は、組換え宿主細胞から異種発現により新規なセルラーゼを生成する方法を提供することである。

【００１２】

さらに本発明の目的は、本発明のセルラーゼをエンコードする核酸配列を提供することである。１の側面において、当該核酸及びアミノ酸配列は本発明の新規なセルラーゼ及びセルラーゼ組成物の商業生産を容易にする。

【００１３】

さらに本発明の目的は、洗剤、織物処理、飼料補助剤及びパルプ及び紙製造において使用するための優れた性質を有する新規なセルラーゼを提供することである。さらなる側面において、当該セルラーゼはバイオマス転換において有用である。

【００１４】

第１の側面において、本発明はＢａｇＣｅｌをエンコードする配列、ＢａｇＣｅｌ遺伝子コード配列に相補的な配列を有する単離ポリヌクレオチド及び当該ポリヌクレオチドを含む組成物を含む。当該ポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたはそれらのアンチセンス類似体である。

【００１５】

１の実施態様において、ＢａｇＣｅｌポリヌクレオチドは、中から高ストリンジェンシー条件下で配列番号１として表される核酸の相補体にハイブリダイズする単離核酸分子を含み、ここで核酸分子はセルロース結合活性を示すＢａｇＣｅｌポリペプチドをエンコードする。

【００１６】

配列番号１として表される配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％またはそれ以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドはＢａｇＣｅｌタンパク質をエンコードできる。特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは配列番号２に実質的に同一な配列を含む。本発明はポリヌクレオチド断片、好ましくは少なくとも約１５－３０のヌクレオチド長さの断片も含む。

【００１７】

第２の側面において、新規なセルラーゼまたは誘導体はバチルスから得られる。好ましくは、本発明のセルラーゼは図２（配列番号２）に従うアミノ酸配列、断片またはそれらの誘導体を含み、活性部分に対して９０％以上の配列同一性、好ましくは９５％以上の配列同一性、及びより好ましくは９７％以上の配列同一性を有する。

【００１８】

第３の側面において、本発明は、本発明のポリペプチドをエンコードし、適当な宿主中ポリペプチド生成を目的とする１以上の制御配列に動作可能に連結した、ヌクレオチド配列を含む核酸構築体に関する。

【００１９】

本発明はさらに、ＢａｇＣｅｌまたは断片またはそれらのスプライス変異体をエンコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを提供し、当該核酸配列は選択宿主中タンパク質の発現に効果的な調節因子に動作可能に連結する。関連する側面において、本発明は当該ベクターを含む宿主細胞を含む。

【００２０】

第４の側面において、本発明は本発明の核酸構築体を含む組換え発現ベクターに関する。

【００２１】

第５の側面において、本発明は本発明の核酸構築体を含む組換え宿主細胞に関する。

【００２２】

本発明は、さらに、組換え技術、ＢａｇＣｅｌをエンコードする核酸配列を含む原核または真核組換え宿主細胞を当該タンパク質の発現を促進するために効果的な条件下で培養し、続いて宿主細胞または細胞培養基からタンパク質を回収することにより、ＢａｇＣｅｌを生成する方法を含む。

【００２３】

第６の側面において、本発明は本発明のポリペプチドを生成する方法に関し、当該方法は以下を含む：（ａ）微生物を培養し、ここで当該微生物は野生型の形態で前記ポリペプチドを生成でき、前記ポリペプチドを生成する工程；及び（ｂ）前記ポリペプチドを回収する工程。

【００２４】

第７の側面において、本発明はセルロースをエタノールに変換するために有用な酵素組成物を提供する。好ましい実施態様において、酵素組成物はＢａｇＣｅｌを含む。当該組成物はさらに、エンドグルカナーゼ及び／またはセロビオヒドロラーゼなどの他のセルラーゼ酵素を含んでもよい。当該組成物はＢａｇＣｅｌを豊富に含むことができる。

【００２５】

１の実施態様において、本発明は、全微生物集団ＤＮＡを周囲から単離し、大腸菌においてゲノムＤＮＡライブラリーを構築し、セルラーゼ活性の発現についてライブラリーをスクリーニングし、セルラーゼ陽性クローン中のセルラーゼ遺伝子を同定し、新規なセルラーゼ酵素をキャラクタライズすることによる、新規な酵素を同定する方法を提供する。

【００２６】

さらに、ここに提供するＢａｇＣｅｌ核酸及びＢａｇＣｅｌタンパク質を検出する分析方法も本発明の一部である。

【００２７】

本発明のさらに別の実施態様において、本発明に従うセルラーゼをエンコードする核酸配列を用いて適当な微生物を形質転換する方法を提供する。前記形質転換微生物から本発明

に従うセルラーゼを生成する方法を提供する。

【００２８】

本発明のさらなる目的は、ストレプトマイセスに特に効果的な発現ベクターを提供することである。ストレプトマイセスは種々のタンパク質生成のための中間宿主細胞として働き、セルラーゼの発現及び生成について、特に高細胞密度で細胞が成長する場合、バチルス宿主細胞を超える多数の利点を提供する。好ましい発現ベクターは、アクチノプラーネスのグルコースイソメラーゼ遺伝子由来のプロモーター配列など調節ポリヌクレオチド配列、ストレプトマイセスセルラーゼ遺伝子由来のシグナル配列及びセルラーゼ、特に本発明のセルラーゼをエンコードするＤＮＡ配列を含む。

【００２９】

本発明の好ましい実施態様において、完全長セルラーゼはバチルスから得ることができる。

【００３０】

本発明のその他の目的、特徴及び利点は以下の詳細な説明から明らかである。しかしながら、詳細な説明及び具体的な実施例は、本発明の好ましい実施態様を示すが、説明目的のため与えられるものであり、本発明の範囲及び概念内で種々の変化及び修正がこの詳細な説明から当業者に明らかであることが当然に理解される。

【００３１】

発明の詳細な説明

本発明を以下の定義及び実施例を用いて参照することにより詳細を説明する。ここに参照する全ての特許及び刊行物、及び当該特許及び刊行物内に開示される全ての配列は明示的に引用するものとする。

【００３２】

特段に示す場合を除いて、ここで用いる全ての技術及び科学用語は本発明の属する技術の当業者にとって理解される意味と同じ意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ、他、Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（微生物学及び分子生物学の辞典）、第２版、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９４）、及びＨａｌｅ＆Ｍａｒｈａｍ，Ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｈａｒｐｅｒ Ｐｅｒｅｎｎｉａｌ，ＮＹ（１９９１）は当業者に本発明で用いる多くの用語の一般的な辞書を提供するものである。ここに記載の方法及び物質に類似または同等のいかなる方法及び物質も本発明を実施及び試験する際に用いることができるが、好ましい方法及び物質を記載する。数値範囲は範囲を定める数字を含める。別に示す場合を除いて、それぞれ核酸は左から右に５’～３’方向；アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシ方向に記載する。実務者は特にＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．、１９８９、及びＡｕｓｕｂｅｌ ＦＭ ｅｔ ａｌ．、１９９３を当業界の定義及び用語のために参照できる。本発明は記載された特定の方法、手順及び試薬に限定されないことは、これらが種々多様であることから当然に理解される。

【００３３】

ここに提供する表題は本発明の種々の側面または実施態様を限定するものではなく、明細書を全体として参照することにより理解できるものである。従って、下記に定義する用語は明細書全体を参照することにより、さらに十分に定義される。

【００３４】

ここに引用する全ての文献は、本発明に関連し得る組成物及び方法を記載及び開示する目的のため参照することによりここに明示的に引用する。

【００３５】

定義

“セルラーゼ”、“セルロース分解酵素”、または“セルラーゼ酵素”は、ここに記載の本発明の細菌性エンドグルカナーゼを意味する。これらの異なる種類のセルラーゼ酵素はセルロース及びその誘導体をグルコースに変換するために相乗的に作用する。

【００３６】
“セルラーゼ”の語はセルロースポリマーをより短いセロ－オリゴ糖オリゴマー、セロビオース及び／またはグルコースに加水分解できる酵素分類をいう。多数のセルラーゼの例として、例えば、エキソグルカナーゼ、エキソセロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ及びグルコシダーゼがあり、セルロース分解性生物、特に真菌及び細菌から得られる。これらの微生物から作られる酵素は、セルロースからグルコースへの転換に有用な３種類の作用を有するタンパク質の混合物である：エンドグルカナーゼ（ＥＧ）、セロビオヒドロラーゼ（ＣＢＨ）、及びβ－グルコシダーゼ。これらの３種の異なるセルラーゼ酵素はセルロース及びその誘導体をグルコースに変換するために相乗的に作用する。
【００３７】
多くの微生物はセルロースを加水分解する酵素を作り、例えば、木材腐朽菌トリコデルマ、土壌細菌Ｔｈｅｒｍｏｍｏｎｏｓｐｏｒａ、バチルス、及びセルロモナス；ストレプトマイセス；及び真菌フミコーラ、アルペルギルス及びフサリウムなどがある。
【００３８】
“宿主細胞”の語はベクターを含み、複製及び／または転写または発現構築体の転写及び翻訳（発現）を助ける細胞を意味する。本発明で用いる宿主細胞は大腸菌などの原核細胞または酵母などの真核細胞、植物、昆虫、両生類または哺乳類細胞などの細胞である。本発明の１の実施態様において、“宿主細胞”はバチルス属の細胞を意味する。本発明の他の好ましい実施態様において、“宿主細胞”はストレプトマイセスの細胞を意味する。ストレプトマイセスは、Ｂｕｃｈａｎａｎ他、Ｔｈｅ Ｓｈｏｒｔｅｒ Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ Ｍａｎｕａｌ Ｆｏｒ Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｖｅ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ（Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｅｎｓ １９８２）において分類されるストレプトマイセス属のひとつである任意の細菌株を意味する。特に好ましいストレプトマイセス株はＳ．ｌｉｖｉｄｅｎｓ、Ｓ．ｒｕｂｉｇｉｎｏｓｕｓ、及びＳ．ｃｏｒｌｉｃｏｌｏｒである。Ｓ．ｌｉｖｉｄｅｎｓはＬｏｍｏｖｓｋａｙａ、他、Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ９：２５８（１９７２）に記載されている。しかしながら、当業者であれば任意の適当な宿主細胞、例えば、細菌、真菌、真核及び植物細胞が使用できることが理解できる。
【００３９】
細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して用いる“組換え体”の語は、該細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸またはタンパク質の挿入により、または天然核酸またはタンパク質の変異により修飾されたこと、または該細胞がそのように修飾された細胞由来であることを示す。従って、例えば、組換え細胞は当該細胞の天然（非組換え）型内では見られない遺伝子を発現し、または発現、または全く発現しない条件下で、通常は異常発現される天然遺伝子を発現する。
【００４０】
“分泌シグナル配列”の語は、大ポリペプチドの構成要素として、ポリペプチドが合成される細胞の分泌経路から当該大ポリペプチドに導かれるポリペプチド（“分泌ペプチド”または“分泌シグナルペプチド”）をエンコードするＤＮＡ配列を示す。当該大ペプチドは普通は分割されて、分泌経路を通過する際に分泌ペプチドが取り除かれ、分泌シグナルペプチド及び通常、成熟ポリペプチドと呼ばれるより小さいペプチドを生じる。
【００４１】
ここで用いる、“セルラーゼ調製物全体”及び“セルラーゼ組成物全体”の語句は交換可能に用いられ、天然及び非天然組成物の両方をいう。“天然”組成物は天然源により生成した組成物であり、例えば、１以上のセロビオヒドロラーゼ型、１以上のエンドグルカナーゼ型、及び１以上のβ－グルコシダーゼ成分を含み、これらの各成分は供給源より生じた比率で見られる。特定の真菌は、エキソセロビオヒドロラーゼまたはＣＢＨ型セルラーゼ、エンドグルカナーゼまたはＥＧ型セルラーゼ及びβ－グルコシダーゼまたはＢＧ型セルラーゼを含む完全なセルラーゼ系を生じる（Ｓｃｈｕｌｅｉｎ、１９８８）。しかしながら、これらの系はＣＢＨ型セルラーゼを欠く場合があり、また、細菌性セルラーゼは通常ＣＢＨ型セルラーゼを含まないか、またはほとんど含まない。天然組成物はセルロー

ス分解酵素に関して非修飾の微生物により生成されたものであり、従って当該成分酵素の比率は天然微生物により生成されるものから変更されていない。

【００４２】

“非天然”組成物は、（１）天然比率または非天然、すなわち変更された比率で成分をセルロース分解酵素と混合；または（２）１以上のセルロース分解酵素を過剰発現または過少発現するように微生物を修飾；または（３）少なくとも１のセルロース分解酵素が欠失するように微生物を修飾；または（４）異種成分セルロース分解酵素を発現するように微生物を修飾することにより生成したこれらの組成物を包含する。

【００４３】

ここで用いる、“プロモーター”の語は下流遺伝子の転写を導くように作用する核酸配列をいう。プロモーターは通常、標的遺伝子が発現する宿主細胞に適したものである。プロモーターはその他の転写及び翻訳調節核酸配列（“制御配列”とも呼ぶ）と一緒に所定の遺伝子を発現するために必要である。通常、転写及び翻訳調節配列は、限定されないが、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列及びエンハンサーまたは活性化配列を含む。プロモーターは通常、下流遺伝子に関連するプロモーターまたは異種のものであり、すなわち、遺伝子に対して機能する限り他の遺伝子または他の微生物由来のものであってもよい。形質転換宿主細胞がバチルスの場合の好ましいプロモーターはａｐｒＥプロモーターである。１の側面において、プロモーターは導入可能プロモーターである。１の側面において、宿主細胞は糸状菌であり、プロモーターはアクセッション番号Ｄ８６２３５でジェンバンク（ＧｅｎＢａｎｋ）に寄託されているＴ．リーゼイ（ｒｅｅｓｅｉ）ｃｂｈ１プロモーターである。他の側面において、プロモーターはＴ．リーゼイ由来のｃｂｈＩＩまたはキシラナーゼプロモーターである。

【００４４】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に位置する場合、“動作可能に連結”する。例えば、分泌リーダー（ｌｅａｄｅｒ）をエンコードするＤＮＡ、すなわちシグナルペプチドは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドのＤＮＡに動作可能に連結し；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響する場合、コード配列に動作可能に連結し；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するために位置する場合、コード配列に動作可能に連結する。通常、“動作可能に連結する”とは、連結ＤＮＡ配列が隣接しており、及び分泌リーダーの場合、隣接し、かつリーディングフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は都合のよい制限部位で連結反応により達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチド・アダプタまたはリンカーを従来実務に従って用いる。

【００４５】

“ＤＮＡ構築体”または“ＤＮＡベクター”とは、新規なセルラーゼをエンコードする１以上のＤＮＡ断片を含むヌクレオチド配列を意味する。“ＤＮＡベクター”には“発現ベクター”が含まれる。通常の発現ベクターは調節配列を含み、例えば、転写及び翻訳ターミネーター、転写及び翻訳開始配列、シグナル配列、及び特定の核酸の発現の調製に有用なプロモーターである。“プロモーター”の語は、タンパク質をエンコードするポリヌクレオチド配列の転写開始の制御に関係するポリヌクレオチド配列を指す通常の意味において用いられる。“シグナル配列”は、所望のタンパク質の宿主からの輸送を生物活性形態で導くことが可能なタンパク質のシグナルペプチドまたは部分をいう。細胞外タンパク質の成熟形態は分泌プロセス中開裂されるシグナル配列を欠く。本発明を限定する趣旨ではないが、シグナルペプチド中のアミノ酸残基の数は約５～約１００アミノ酸残基がよい。シグナル配列は、ＤＮＡの連結またはセルラーゼをエンコードするＤＮＡの挿入を可能にするクローニング部位を提供するように修飾できる。ベクターは任意で、少なくとも１の独立ターミネーター配列、原核、真核または両方（例えば、シャトルベクター）においてカセットの複製を可能にする配列、及び原核及び真核系両方用の選択マーカーを含むジェネリック発現カセットを含む。ベクターは原核、真核または両方において複製及び統合するために適している。Ｇｉｌｉｍａｎ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｇｅｎｅ ８：８１－９

７（１９７９）；Ｒｏｂｅｒｔ、他、Ｎａｔｕｒｅ ３２８：７３１－７３４（１９８７）；Ｂｅｒｇｅｒ ａｎｄ Ｋｉｍｍｅｌ，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ １５２、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，サンディエゴ、カリフォルニア州（“Ｂｅｒｇｅｒ”）；Ｓｃｈｅｉｄｅｒ，Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ ６４３５：１０（１９９５）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ、他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版）Ｖｏｌ．１－３、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（１９８９）（“Ｓａｍｂｒｏｏｋ”）；及びＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌ、他、（編集）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．とＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃとの共同事業（１９９７、補足）（“Ａｕｓｕｂｅｌ”）を参照されたい。ストレプトマイセスに有用なクローニングベクターは公知であり、米国特許第４，３３８，３９７号、第４，４１１，９９４号、第４，５１３，０８５号、第４，５１３，０８６号、第４，７４５，０５６号、第５，５１４，５９０号及び第５，６２２，８６６号及びＷＯ８８／０７０７９を参照できる。

【００４６】

ここで用いる“遺伝子”の語は、ポリペプチド鎖の生成に関与するＤＮＡ断片を意味し、コード領域の先行及び後の領域、例えば５’非翻訳（５’ＵＴＲ）または“リーダー”配列及び３’ＵＴＲまたは“トレーラー”配列、及び個々のコード断片（エキソン）間の介在配列（イントロン）などを含んでも含まなくてもよい。

【００４７】

核酸の一部に言及して用いる“異種”の語は、当該核酸が、通常は同じ関係において天然では見られない２以上のサブ配列を含むことを示す。例えば、当該核酸は通常、遺伝子組換えにより生成し、例えば新しい機能的核酸を作るために配置した関連性のない遺伝子から２以上の配列を有し、例えば、１の供給源からプロモーターを有し、他の供給源からコード領域を有する。同様に、異種タンパク質は同じ関係でお互いに天然では見られない２以上のサブ配列をいうことも多い（例えば、融合タンパク質）。

【００４８】

ここで用いる“単離”または“精製”の語は、天然に結合する少なくとも１の成分から除去された核酸またはアミノ酸をいう。

【００４９】

本発明の内容において、“実質的に純粋なポリペプチド”とは、天然に関連するその他のポリペプチド物質を多くとも１０重量％で含む、ポリペプチド調製を意味する（その他のポリペプチド物質のより低い割合は、好ましくは、例えば、多くとも８重量％、多くとも６重量％、多くとも５重量％、多くとも４重量％、多くとも３重量％、多くとも２重量％、多くとも１重量％、及び多くとも１／２重量％である）。従って、実質的に純粋なポリペプチドは少なくとも９２％純粋であることが好ましく、すなわち、当該ポリペプチドは調製剤中に存在する少なくとも９２重量％の合計ポリペプチド物質を構成し、及びより高い割合は好ましく、例えば、少なくとも９４％純粋、少なくとも９５％純粋、少なくとも９６％純粋、少なくとも９６％純粋、少なくとも９７％純粋、少なくとも９８％純粋、少なくとも９９％純粋及び多くとも９９．５％純粋である。ここに開示するポリペプチドは好ましくは実質的に純粋な形態である。特に、ここに開示するポリペプチドが“本質的に純粋形態”であることが好ましく、すなわち、ポリペプチド調製物が天然に関連するその他のポリペプチド物質を本質的に含まないことが好ましい。これは例えば、公知の組換え方法手段によりポリペプチドを調製することにより達成できる。ここで、“実質的に純粋なポリペプチド”の語は、“単離ポリペプチド”及び“単離形態のポリペプチド”と同義である。

【００５０】

通常、ＢａｇＣｅｌをエンコードする核酸分子を中から高ストリンジェンシー条件下で

配列番号２（ＢａｇＣｅｌ）としてここに提供する配列に対してハイブリダイズする。しかしながら、場合によっては、実質的に異なるコドン使用を有するＢａｇＣｅｌ－エンコードヌクレオチド配列を用いるが、当該ＢａｇＣｅｌ－エンコードヌクレオチド配列によりエンコードされたタンパク質は天然タンパク質と同じまたは実質的に同じアミノ酸配列を有する。例えば、コード配列は特定の原核または真核発現系においてＢａｇＣｅｌのより速い発現を促進するために、宿主によって利用される特定のコドン頻度に従って修飾できる。例えば、Ｔｅ’ｏ、他（２０００）は糸状菌における遺伝子発現の最適化について説明している。

【００５１】

核酸配列は、２つの配列が特異的に中程度から高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション及び洗浄条件下でお互いにハイブリダイズする場合、対照核酸配列に“選択的にハイブリダイズ”すると考えられる。ハイブリダイゼーション条件は核酸結合複合体またはプローブの融点（Ｔｍ）に基づく。例えば、“最大ストリンジェンシー”は通常、約Ｔｍ－５℃で起こり（プローブのＴｍより５℃低い）；“高ストリンジェンシー”はＴｍより約５－１０℃低く；“中間”または“中ストリンジェンシー”はプローブのＴｍより約１０－２０℃低く；及び“低ストリンジェンシー”はＴｍより約２０－２５℃低い。機能的に、最大ストリンジェンシー条件はハイブリダイゼーションプローブと厳密に同一またはほぼ厳密に同一な配列を同定するために用いることができ、高ストリンジェンシー条件はプローブと約８０％以上の配列同一性を有する配列を同定するために用いる。

【００５２】

中から高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は当業界に公知である（例えば、明示的にここに引用するＳａｍｂｒｏｏｋ、他、１９８９、第９章及び１１章、及びＡｕｓｕｂｅｌ、他、１９９３を参照）。高ストリンジェンシー条件の例としては、５０％ホルムアミド、５Ｘ　ＳＳＣ、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、０．５％　ＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌ変性キャリアＤＮＡ中、約４２℃でのハイブリダイゼーション、及び続いて２Ｘ　ＳＳＣ及び０．５％　ＳＤＳ中、室温で２回洗浄及びさらに０．１Ｘ　ＳＳＣ及び０．５％　ＳＤＳ、４２℃で２回洗浄を含む。

【００５３】

ここで用いる細胞に関する“形質転換”、“安定に形質転換された”または“トランスジェニック”の語は、細胞が、ゲノム内に統合された、または複数の世代を通して維持されるエピソームプラスミドとして非天然（異種）核酸配列を有することを意味する。

【００５４】

ここで用いる“発現”の語は、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生成されるプロセスをいう。当該プロセスは転写及び翻訳の両方を含む。

【００５５】

細胞への核酸配列の挿入に関する“導入”の語は“トランスフェクション”または“形質転換”または“形質導入”を意味し、原核または真核細胞内への核酸配列の組込みに関する場合を含み、ここで核酸配列は細胞のゲノム内（例えば、染色体、プラスミド、色素体またはミトコンドリアＤＮＡ）に組み込まれることができ、自己レプリコンに変換され、または一時的に発現される（例えば、トランスフェクトされたｍＲＮＡ）。

【００５６】

“ＢａｇＣｅｌ発現”の語はＢａｇＣｅｌセルラーゼ遺伝子の転写及び翻訳、前駆体ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ポリペプチド、翻訳後プロセッシングポリペプチドの生成物ということになる。例として、ＢａｇＣｅｌ発現の分析は、ＢａｇＣｅｌタンパク質のウエスタンブロット、ＣＢＨ１　ｍＲＮＡのノーザンブロット分析及び逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）分析、及びＳｈｏｅｍａｋｅｒ　Ｓ．Ｐ．及びＢｒｏｗｎ　Ｒ．Ｄ．Ｊｒ．（Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９７８，５２３：１３３－１４６）及びＳｃｈｕｌｅｉｎ（１９８８）に記載のエンドグルカナーゼ活性分析を含む。

【００５７】

ここで用いる“界面活性剤”の語は、表面活性特性を有するものとして当業界で通常認

識されている任意の化合物をいう。従って、例えば、界面活性剤は陰イオン性、陽イオン性及び非イオン性界面活性剤を含み、例えば洗剤において通常見られるものである。陰イオン性界面活性剤は、直鎖または分岐鎖アルキルベンゼンスルフォネート；直鎖または分岐鎖アルキル基またはアルケニル基を有するアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩；アルキルまたはアルケニル硫酸塩；オレフィンスルフォネート；及びアルカンスルフォネートが挙げられる。両性界面活性剤は第４級アンモニウム塩スルフォネート及びベタイン型両性界面活性剤が挙げられる。当該両性界面活性剤は同じ分子内に正及び負電荷の両方の基を有する。非イオン性界面活性剤はポリオキシアルキレンエーテル及び高脂肪酸アルカノールアミドまたはその酸化アルキレン付加、脂肪酸グリセリンモノエステル等を含むことができる。

【００５８】

ここで用いる“セルロース含有繊維”の語は、セルロースを含有する綿または非綿、またはセルロースブレンド、例えば天然セルロース誘導体及び人工セルロース誘導体（例えば、ジュート（黄麻）、亜麻布、ラミー、レーヨン及びリヨセル）を含有する綿または非綿から作られた任意の織布または不織布、糸または繊維をいう。

【００５９】

ここで用いる、“綿含有繊維”の語は、純粋な綿または綿ブレンドから作られた織布または不織布、糸または繊維をいい、綿織物、綿ニット、綿デニム、綿糸、原綿等を含む。

【００６０】

ここで用いる、“ストーンウォッシュ組成物”の語は、セルロース含有繊維をストーンウォッシュする際に用いる製剤をいう。ストーンウォッシュ組成物は販売前、すなわち製造プロセス時にセルロース含有繊維を修正するために用いる。これに対し、洗剤組成物は汚れた衣類の洗浄を目的とするものであり、製造プロセス時には用いられない。

【００６１】

ここで用いる“洗剤組成物”の語は汚れたセルロース含有繊維を洗濯するための洗浄手段で用いることを意図した混合物をいう。本発明において、当該組成物はセルラーゼ及び界面活性剤に加えて、さらに加水分解酵素、ビルダー、漂白剤、漂白活性化剤、青味剤及び蛍光色素、ケーキング防止剤、マスキング剤、セルラーゼ活性化剤、酸化防止剤及び可溶化剤を含むことができる。

【００６２】

ここで用いる“活性”及び“生物活性”の語は、特定タンパク質に関する生物活性をいい、ここで交換可能に用いられる。例えばプロテアーゼに関する酵素活性はタンパク質分解性であり、従って、プロテアーゼはタンパク質分解活性を有する。従って、所定タンパク質の生物活性は通常、当業者とって当該タンパク質に起因する任意の生物活性をいうことになる。

【００６３】

酵素溶液中で用いる場合、ＢａｇＣｅｌ成分は通常、バイオマスからの可溶性糖の放出速度を最高にするために十分な量で加える。加えるＢａｇＣｅｌ成分の量は、糖化されるバイオマスの種類に依存し、当業者により容易に測定できる。しかしながら、使用時の、セルラーゼ組成物中に存在するその他のセルラーゼ型成分と比較した、ＢａｇＣｅｌ成分の重量％は、好ましくは約１、好ましくは約５、好ましくは約１０、好ましくは約１５、または好ましくは約２０重量％～好ましくは約２５、好ましくは約３０、好ましくは約３５、好ましくは約４０、好ましくは約４５、または好ましくは約５０重量％である。さらに、好ましい範囲は約０．５～約１５重量％、約０．５～約２０重量％、約１～約１０重量％、約１～約１５重量％、約１～約２０重量％、約１～約２５重量％、約５～約２０重量％、約５～約２５重量％、約５～約３０重量％、約５～約３５重量％、約５～約４０重量％、約５～約４５重量％、約５～約５０重量％、約１０～約２０重量％、約１０～約２５重量％、約１０～約３０重量％、約１０～約３５重量％、約１０～約４０重量％、約１０～約４５重量％、約１０～約５０重量％、約１５～約２０重量％、約１５～約２５重量％、約１５～約３０重量％、約１５～約３５重量％、約１５～約４０重量％、約１５～約

４５重量％、約１５～約５０重量％である。

【００６４】

ＩＩ．分子生物学

本発明は組換え遺伝学の分野における一般的な技術に依拠する。本発明で使用する一般的な方法を開示する基本テキストは、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（分子クローニング）、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版、１９８９）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ（遺伝子導入及び発現）：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９９０）；及びＡｕｓｕｂｅｌ、他、編集。Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９４）が挙げられる。

【００６５】

高レベル発現でクローン遺伝子を得るために、異種遺伝子はプロモーターからの距離が、好ましくは天然セルラーゼ遺伝子内の場合とほぼ同じ距離で位置する。当業界に公知の通り、しかしながら、ある程度の距離の変動はプロモーター機能を損なうことなく適応させることができる。

【００６６】

天然プロモーターを１以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失により、その機能を変化させることなく修飾できることは当業者であれば知っていることである。本発明の実施はプロモーターに対するそのような変異を包含するが、それに拘束されない。

【００６７】

発現ベクター／構築体は通常、異種配列の発現に必要なその他全ての要素を含む転写ユニットまたは発現カセットを含む。従って、一般的な発現カセットは異種核酸配列に動作可能に連結するプロモーター及び転写、リボソーム結合部位及び翻訳停止の効率的なポリアデニル化に必要なシグナルを含む。当該カセットの他の要素は、ゲノムＤＮＡを構造遺伝子、機能的スプライス供与体及び受容体部位を含むイントロンとして用いる場合、エンハンサーを含んでもよい。

【００６８】

本発明の実施は、遺伝子構築体中のプロモーター選択により制限されない。プロモーター選択についての唯一の制限は、使用される宿主細胞において機能的であることである。形質転換宿主細胞がバチルスである場合の好ましいプロモーターは、ａｐｒＥプロモーターである。

【００６９】

プロモーター配列に加え、発現カセットは、効果的に停止できるように構造遺伝子の下流に転写停止領域も含むべきである。停止領域はプロモーター配列と同じ遺伝子から得られ、または異なる遺伝子から得ることもできる。

【００７０】

遺伝子情報を細胞内に輸送するために用いる特定の発現ベクターは特に重要ではない。真核または原核細胞内で発現するために使用される任意の従来ベクターが使用できる。標準的な細菌性発現ベクターは、バクテリオファージλ及びＭ１３、及びプラスミド、例えばｐＢＲ３２２ベースプラスミド、ｐＳＫＦ、ｐＥＴ２３Ｄ、及び融合発現系、例えばＭＢＰ、ＧＳＴ及びＬａｃＺが挙げられる。エピトープ標識も単離方法を容易にするために組換えタンパク質に加えることができ、例えば、ｃ－ｍｙｃである。

【００７１】

また、発現ベクター内に通常含まれる要素は、レプリコン、組換え体プラスミドを含む細菌選択を可能にする抗生物質耐性をエンコードする遺伝子、及び異種配列の挿入を可能にするプラスミドの非必須領域における固有制限部位も含む。特定の抗生物質耐性遺伝子の選択は重要でなく、当業者に公知の任意の多くの耐性遺伝子が適している。

【００７２】

本発明の形質転換方法は、形質転換ベクターの全部または一部を糸状菌のゲノム内に安定して統合することができる。しかしながら、自己複製の細胞外形質転換ベクターの維持

を生じる形質転換も考えられる。

【００７３】

本発明のセルラーゼをエンコードする遺伝子はλ－ファージ（発現）ベクター及び大腸菌宿主細胞を用いてクローンできる。（もしくは、保存ドメイン上で設計されたコンセンサスプライマーを用いるＰＣＲクローニングも使用できる。）出願人は、本発明のセルラーゼをエンコードする遺伝子の形質転換及び大腸菌内での発現により、活性タンパク質を生じることを見出した。大腸菌内での第１のクローニング工程後、本発明のセルラーゼ遺伝子はバチルスまたはストレプトマイセス種などのより好ましい工業用発現宿主、アスペルギルスまたはトリコデルマなどの糸状菌、またはサッカロマイセスなどの酵母に移動できる。これらの宿主微生物内で得られる高レベル発現及び分泌により、発酵培地中、セルラーゼの蓄積が可能となり、その後その培地から回収できる。

【００７４】

プロテアーゼ欠失バチルス株の好ましい一般的な形質転換及び発現手順は、ここに引用するＦｅｒｒａｒｉ、他、米国特許第５，２６４，３６６号に開示されている。アスペルギルスにおける形質転換及び発現は、例えば、ここに引用する、Ｂｅｒｋａ、他、米国特許第５，３６４，７００号に記載されている。

【００７５】

多くの標準的なトランスフェクション方法が、異種タンパク質を大量に発現するトリコデルマ・リーゼイ細胞株を生成するために使用できる。ＤＮＡ構築体をトリコデルマのセルラーゼ生成株内に導入するための開示方法のいくつかは、Ｌｏｒｉｔｏ，Ｈａｙｅｓ，ＤｉＰｉｅｔｒｏ及びＨａｒｍａｎ，１９９３、Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．２４：３４９－３５６；Ｇｏｌｄｍａｎ，ＶａｎＭｏｎｔａｇｕ及びＨｅｒｒｅｔａ－Ｅｓｔｒｅｌｌａ，１９９０，Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．１７：１６９－１７４；Ｐｅｎｔｔｉｌａ，Ｎｅｖａｌａｉｎｅｎ，Ｒａｔｔｏ，Ｓａｌｍｉｎｅｎ及びＫｎｏｗｌｅｓ，１９８７，Ｇｅｎｅ　６：１５５－１６４、アスペルギルスについて、Ｙｅｌｔｏｎ，Ｈａｍｅｒ及びＴｉｍｂｅｒｌａｋｅ，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：１４７０－１４７４、フサリウム・Ｂａｊａｒ，Ｐｏｄｉｌａ及びＫｏｌａｔｔｕｋｕｄｙ，１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：８２０２－８２１２、ストレプトマイセスについて、Ｈｏｐｗｏｏｄ、他、１９８５、Ｔｈｅ　Ｊｏｈｎ　Ｉｎｎｅｓ　Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｎｏｒｗｉｃｈ，ＵＫ及びバチルスについて、Ｂｒｉｇｉｄｉ，ＤｅＲｏｓｓｉ，Ｂｅｒｔａｒｎｉ，Ｒｉｃｃａｒｄｉ及びＭａｔｔｅｕｚｚｉ，１９９０，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．５５：１３５－１３８）が挙げられ、全てここに引用する。

【００７６】

しかしながら、外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入する任意の公知手段を用いることができる。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、原形質融合、電気泳動法、バイオリスティック、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウイルスベクター及びクローンゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡまたはその他の外来ゲノム物質を宿主細胞内に導入するその他の公知方法の使用を含む（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ．他、上記を参照）。また、米国特許第６，２５５，１１５号に記載のアグロバクテリウム媒介トランスフェクション方法も使用される。必要なのは、使用する特定の遺伝子工学手順が少なくとも１の遺伝子を異種遺伝子を発現できる宿主細胞内にうまく導入できるということだけである。

【００７７】

発現ベクターが細胞内に導入された後、トランスフェクト細胞はセルラーゼ遺伝子プロモーター配列の制御下で遺伝子発現に有利な条件の下、培養される。形質転換細胞の大バッチは以下に記載の通り培養できる。最終的に、生成物は標準技術を用いて培養基から回収する。

【００７８】

従って、本発明は本発明のセルラーゼの発現及び高められた分泌を提供し、発現は天然

セルラーゼ遺伝子、融合ＤＮＡ配列及び種々の異種構築体を含むセルラーゼ遺伝子プロモーター配列に制御される。また、本発明は本発明のセルラーゼを高レベルで発現及び分泌する方法も提供する。

【００７９】

ＩＩＩ．核酸及びエンコードされたタンパク質配列の同定

バチルス・ａｇａｒａｄｈａｅｒａｎｓ（ＤＳＭ８７２１）由来のゲノムライブラリーを当業者に公知の標準技術を用いて調製した。この微生物はアルカリ性セルラーゼ（エンド－１，４－ベーター－グルカナーゼ）を生成し、これはグリコシル・ヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ５Ａ、ＥＣ３．２．１．４、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ：０８５４６５、エントリー名ＧＵＮ５＿ＢＡＣＡＧ．ＥＢＩアクセッション番号（ＡＦ０６７４２８）のセルラーゼファミリー５に属し、その遺伝子は１２０３ｂｐ長である（Ｄａｖｉｅｓ、他、１９９８）。セルラーゼ陽性クローンはプレート分析において発生率１／３０００で検出された。本発明の側面に従う遺伝子を単離する方法において、この酵素のコード配列に基づく変性プライマーを用いた。しかしながら、意外なことに、公知のＢ．ａｇａｒａｄｈａｅｒａｎｓセルラーゼを増幅することが知られるプライマーを用いてもＰＣＲ生成物は得られなかった。従って、セルラーゼをコードする挿入の完全な配列はプライマーウォーキングにより測定した。

【００８０】

本発明の第２の側面に従う遺伝子を単離する方法は、配列リストに示す配列番号２のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列に対する相同性を利用する。そのような方法の例としては以下を含む：

ａ）ＢａｇＣｅｌ遺伝子を推定上含む遺伝子ライブラリーをプローブとして当該ヌクレオチド配列を用いてスクリーニングする工程。

【００８１】

ｂ）ヌクレオチド配列情報に基づいてプライマーを調製し、次にテンプレートとしてＢａｇＣｅｌ遺伝子を推定上含むサンプルを用いてＰＣＲを行う工程。

【００８２】

より具体的には、上記ａ）工程は、ａ）セルラーゼ遺伝子を推定上含む遺伝子ライブラリーを調製し、配列リストに示す配列番号２のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列を用いて遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、当該遺伝子ライブラリー由来の配列リストに示す配列番号２のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列とハイブリダイズする配列を選択し、次に、選択された配列を単離し、前記遺伝子ライブラリーから選択及び単離された配列由来のＢａｇＣｅｌ遺伝子を単離する工程、を含む。

【００８３】

遺伝子ライブラリーはゲノムＤＮＡライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリーであってもよく、公知の手順に従って調製できる。

【００８４】

ＩＶ．タンパク質発現

本発明のタンパク質は、発現がプロモーター配列に制御される本発明のセルラーゼ遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換された細胞を培養することにより生成される。本発明は特にタンパク質の細胞内及び／または細胞外での生成を高めるために有用である。タンパク質は同種または異種である。

【００８５】

また、本発明のタンパク質は、他の、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合された目的タンパク質を含むキメラ分子を形成するための方法で修飾できる。１の実施態様において、このようなキメラ分子は目的タンパク質と抗標識抗体が選択的に結合できるエピトープを備える標識ポリペプチドとの融合を含む。エピトープ標識は通常、目的タンパク質のアミノ－、またはカルボキシ末端に位置する。

【００８６】

種々の標識ポリペプチド及びそれぞれの抗体は当業界で公知である。例としては、ポリ－ヒスチジン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ）またはポリ－ヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）標識；ＨＩＳ６及び金属キレート標識、ｆｌｕ　ＨＡ標識ポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５（Ｆｉｅｌｄ、他、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：２１５９－２１６５（１９８８））；ｃ－ｍｙｃ標識及びその８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体（Ｅｖａｎ、他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　５：３６１０－３６１６（１９８５））；及び単純ヘルペスウイルス性糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）標識及びその抗体（Ｐａｂｏｒｓｋｙ、他、Ｐｔｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　３（６）：５４７－５５３（１９９０））が挙げられる。その他の標識ポリペプチドは、ＦＬＡＧ－ペプチド（Ｈｏｐｐ、他、Ｂｉｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：１２０４－１２１０（１９８８））；ＫＴ３エピトープペプチド（Ｍａｒｔｉｎ、他、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５５：１９２－１９４（１９９２）；チューブリン・エピトープペプチド（Ｓｋｉｎｎｅｒ、他、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：１５１６３－１５１６６（１９９１））；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチド標識（Ｌｕｔｚ－Ｆｒｅｙｅｒｍｕｔｈ、他、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：６３９３－６３９７（１９９０））が挙げられる。

【００８７】

前記ＢａｇＣｅｌ遺伝子の発現に適当な条件は、本発明のセルラーゼの成長及び／または発現に必要な成分を培養物に提供する工程を含む。タンパク質の生成に最適な条件は宿主細胞の選択に伴って、及び発現するタンパク質の選択に伴って変化する。そのような条件は、一般的な実験または最適化により当業者により容易に確かめられる。

【００８８】

目的タンパク質は通常、発現後に精製または単離される。目的タンパク質は、サンプル中に存在する他の成分に応じて、当業者に公知の種々の方法で単離または精製できる。標準精製方法は電気泳動、分子、免疫学及びクロマトグラフィー技術を含み、イオン交換、疎水性、親和性及び逆相ＨＰＬＣクロマトグラフィー及びクロマト分画を含む。例えば、目的タンパク質は目的抗体カラムの標準抗タンパク質を用いて精製できる。また限外ろ過及びダイアフィルトレーション技術も、タンパク濃度と併せて、有用である。適当な精製技術に関する一般的な手引きは、Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｔｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ（１９８２）を参照されたい。必要な精製の程度は目的タンパク質の使用に応じて変化する。時には精製が必要ない場合もある。

【００８９】

Ｖ．セルラーゼの有用性

本発明に従う織物処理は、本発明のセルラーゼを含む組成物を用いた織物加工または織物洗浄が考えられる。そのような処理は、限定されないが、ストーンウォッシュ、セルロース含有繊維の生地、手触り及び／または外観の修正、またはセルロース含有繊維の製造または洗浄／修繕時に用いられるその他の技術を含む。さらに、本発明の文脈中の処理とは、セルロース系布または繊維から“未成熟”綿または“死”綿を取除くことも考えられる。未成熟綿は成熟綿よりも著しくアモルファスが多く、例えば不規則な染色を原因とする。本発明の組成物は、汚れた製造時のセルロース含有布を洗浄する際に使用するセルラーゼ成分をさらに含む。例えば、本発明のセルラーゼは洗濯物を洗う洗剤組成物に使用できる。本発明に有用な洗剤組成物は前洗浄用、前含浸用（ｐｒｅ－ｓｏａｋ）、及び家庭用色修復組成物などの特定の剤形を含む。そのような処理組成物はここに記載するように、希釈が必要な濃縮形態または希釈溶液形態またはセルロース含有布に直接適用できる形態でもよい。織物をセルラーゼ処理するための一般的な処理技術は例えば、欧州出願第２２０　０１６及びＧＢ出願第１，３６８，５９９号及び２，０９５，２７５号に記載されている。

【００９０】

本発明に従うセルロース系材料の処理は、当業界に公知の目的に関して動物飼料、パルプ及び／または紙、食品及び穀物を処理することがさらに考えられる。例えば、セルラー

ゼは動物飼料の価値を増加させることが知られ、また、木材パルプの水切れ能を改善し、食品製造を高め、穀物湿式粉砕法または乾式製粉法時に穀物中の繊維を減少することが知られる。

【００９１】

本発明に従う処理は、効果的な量でセルラーゼまたはセルラーゼと一緒にその他の任意の成分、例えば緩衝液、界面活性剤、及び／または精練剤との組み合わせを含む水溶液を調製することを含む。効果的な量のセルラーゼ酵素組成物とは、意図した目的のために十分なセルラーゼ酵素の濃度である。従って、例えば、本発明に従うストーンウオッシュ組成物における“効果的な量”のセルラーゼは、所望の効果を与える量であり、例えば、縫い目及びはぎ布上の擦り切れた及び色あせた外観を生じる。同様に、セルロース－含有布の手触り及び／または外観の改善を意図した組成物中のセルラーゼの“効果的な量”は、適度に手触りの改善を生じる量であり、例えば、布の滑らかさまたは外観の改善、例えば、布の外観の鮮明さを減少する傾向にある毛玉及び繊維を取除くことである。また、使用するセルラーゼの量は、使用する設備、使用するプロセス・パラメーター（セルラーゼ処理溶液の温度、セルラーゼ溶液への曝露時間等）及びセルラーゼ活性（例えば、特定の溶液は低濃度のセルラーゼが必要であり、より活性の低いセルラーゼ組成物と比較して、より活性の高いセルラーゼ組成物を使用する）に依存する。処理布に添加する処理水溶液中の正確なセルラーゼ濃度は上記の要件及び所望の結果に基づいて当業者により容易に測定できる。ストーンウォッシュ工程において、通常、セルラーゼの濃度は処理水溶液中、約０．５～５，０００ｐｐｍが好ましく、及び最も好ましくは約１０～２００ｐｐｍ合計タンパク質である。セルロース含有布の手触り及び／または外観を改善するための組成物において、処理水溶液中に存在するセルラーゼ濃度は、約０．１～２０００ｐｐｍが好ましく、及び最も好ましくは約０．５～２００ｐｐｍ合計タンパク質である。

【００９２】

好ましい処理実施態様において、緩衝液は処理組成物中で、使用するセルラーゼが活性を示す範囲内で緩衝液の濃度が溶液のｐＨを維持するのに十分な程度で用いる。セルラーゼが活性を示すｐＨは用いるセルラーゼの性質に依存する。使用する緩衝液の正確な濃度は当業者が用意に考慮に入れることができるいくつかの要素に依存する。例えば、好ましい実施態様において、緩衝液及び緩衝液濃度は、最適なセルラーゼ活性に必要なｐＨの範囲内で最終的なセルラーゼ溶液のｐＨを維持するために選択される。本発明のセルラーゼの最適なｐＨ範囲の決定は公知の技術に従って確認できる。セルラーゼの活性範囲内のｐＨでの適当な緩衝液も当業者に公知である。

【００９３】

セルラーゼ及び緩衝液に加えて、処理組成物は任意で界面活性剤を含むことができる。適当な界面活性剤としては、利用するセルラーゼ及び布と適合性のある界面活性剤を含み、例えば、陰イオン性、非イオン性、及び両イオン性界面活性剤が挙げられる。適当な陰イオン性界面活性剤は、限定されないが、直鎖または分岐鎖アルキルベンゼンスルフォネート；直鎖または分岐鎖アルキル基またはアルケニル基を有するアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩；アルキルまたはアルケニル硫酸塩；オレフィンスルフォネート；アルカンスルフォネート等が挙げられる。陰イオン性界面活性剤に関する適当な対イオンは、限定されないが、アルカリ金属イオン、例えばナトリウム及びカリウム；アルカリ土類金属イオン、例えば、カルシウム及びマグネシウム；アンモニウムイオン；及び炭素数２または３の１～３のアルカノール基を有するアルカノールアミンが挙げられる。両性界面活性剤は、例えば、第４級アンモニウム塩スルフォネート及びベタイン型両性界面活性剤が挙げられる。当該両性界面活性剤は同じ分子内に正及び負電荷の両方の基を有する。非イオン性界面活性剤は通常、ポリオキシアルキレンエーテル及び高脂肪酸アルカノールアミドまたはその酸化アルキレン付加、及び脂肪酸グリセリンモノエステルを含むことができる。界面活性剤の混合物も当業者に公知の手段で用いることができる。

【００９４】

濃縮セルラーゼ組成物はここに記載の方法において使用するために調製できる。このよ

うな濃縮物は濃縮した量の上述のセルラーゼ組成物、緩衝液及び界面活性剤を、好ましくは水溶液中に含む。そのように処方された場合、セルラーゼ濃縮物は、必要な濃度で各成分を含むセルラーゼ調製物を素早く、正確に調製するために水で容易に希釈できる。水性濃縮物を処方した場合、これらの濃縮物は希釈でき、上述のセルラーゼ溶液中において必要な成分濃度に達することができる。明らかなことであるが、このようなセルラーゼ濃縮物により、セルラーゼ溶液の容易な処方が可能となり、使用場所への組成物の輸送が実現可能なものとなる。処理濃縮物は当業者が認識する任意の形態をとることができ、例えば、液体、乳液、ゲルまたはペーストである。このような形態は当業者に公知である。

【００９５】

固体セルラーゼ濃縮物を用いる場合、セルラーゼ組成物は顆粒、粉末、凝集体または固体ディスクである。顆粒は、洗浄媒体内での顆粒溶解速度を減少させる物質を含むように処方できる。当該物質及び顆粒は、その全体をここに引用する米国特許第５，２５４，２８３号に開示されている。

【００９６】

その他の物質も所望により本発明のセルラーゼ組成物と一緒に使用または添加でき、例えば、組成物の最終的な用途に応じて石、軽石、充填剤、溶媒、酵素活性化剤、及び抗再沈殿剤が挙げられる。

【００９７】

例として、ストーンウオッシュ法を詳細に説明するが、記載のパラメーターはその他の用途のため、すなわち、布の感触及び／外観改善のために、当業者により容易に修正される。セルロース含有布は、処理組成物とストーンウオッシュ組成物を混合することにより、効果的な量のセルラーゼを含むストーンウオッシュ組成物を含有したセルラーゼと接触させ、従って、セルラーゼ酵素を布の近くまで持っていく。次に、セルラーゼ及び布を含む水溶液を攪拌する。処理組成物が水溶液の場合、布を当該水溶液中に直接含浸できる。同様に、ストーンウオッシュ組成物が濃縮物の場合、濃縮物はセルロース含有布と一緒に水槽内で希釈する。ストーンウオッシュ組成物が固体形態の場合、例えば、前洗浄ゲルまたは固体スティックの場合、ストーンウオッシュ組成物は組成物を布または洗浄溶液につけながら直接接触してもよい。

【００９８】

セルロース含有布は、酵素活性がセルロース含有布にストーンウオッシュ外観を与えることができる効果的な条件下でストーンウオッシュ溶液を用いて培養される。例えば、ストーンウオッシュ中のｐＨ、溶液比、温度及び反応時間はストーンウオッシュ組成物が作用する条件を最適化するために調節できる。“効果的な条件”とは必然的に、セルラーゼ酵素が効果的にセルロース含有布と反応することが可能なｐＨ、溶液比、及び温度をいい、この場合、ストーンウオッシュ効果を生じる。本発明に従ってストーンウオッシュ組成物を用いる条件を最大化することは当業者の能力の範囲内である。

【００９９】

ここで用いるストーンウオッシュ中の溶液比、すなわち、ストーンウオッシュ組成物溶液の重量（すなわち、洗浄溶液）と布重量との比は通常、デニム生地に所望のストーンウオッシュ効果を達成するために十分な量であり、使用する方法に依存する。好ましくは、溶液比は約４：１～約５０：１であり、より好ましくは約５：１～約２０：１、及び最も好ましくは約１０：１～約１５：１である。

【０１００】

本発明のストーンウオッシュ組成物を用いるストーンウオッシュ時の反応温度は２つの競合因子に支配される。まず、高温に対応して、通常、反応速度が高められ、すなわち、反応が速まり、低温の場合に必要な反応時間と比較して反応時間を減少させることができる。従って、反応温度は通常、少なくとも約１０℃以上である。第２に、セルラーゼは所定の反応温度以上で活性を失うタンパク質であり、当該温度は使用するセルラーゼの性質に依存する。従って、反応温度が高くなりすぎた場合、セルロース分解活性はセルラーゼ変性の結果として失われる。当業界において標準的なセルラーゼ使用温度は通常、３５℃

～６５℃の範囲であり、これらの条件が本発明のセルラーゼにも適したものであると考えられるが、最適な温度条件は使用される特定のセルラーゼに関して公知技術に従い、確認するべきである。

【０１０１】

反応時間はストーンウオッシュが生じる特定の条件に依存する。例えば、ｐＨ、温度及びセルラーゼ濃度はすべて最適な反応時間に影響する。通常、反応時間は約５分～約５時間であり、好ましくは約１０分～約３時間、及び最も好ましくは約２０分～約１時間である。

【０１０２】

本発明のさらに好ましい実施態様に従い、本発明のセルラーゼは洗剤組成物中に用いてもよい。本発明に従う洗剤組成物は前洗浄組成物、前含浸（ｐｒｅ－ｓｏａｋ）組成物として、または標準洗浄またはすすぎサイクル間の洗浄に有用である。好ましくは、本発明の洗剤組成物は効果的な量のセルラーゼ、界面活性剤を含み、及び任意で下記のその他の成分を含む。

【０１０３】

本発明の洗剤組成物で使用される効果的な量のセルラーゼは、セルロース含有布にセルラーゼにより生じることが知られる所望の効果、例えば毛羽取り、柔軟化、毛羽防止、表面繊維除去、抗灰色化及び洗浄効果を与えるために十分な量である。好ましくは、洗剤組成物中のセルラーゼは洗剤の約１０ｐｐｍ～約２０，０００ｐｐｍ濃度で用いる。

【０１０４】

洗剤組成物中で使用されるセルラーゼ酵素の濃度は好ましくは、水媒体中へ希釈して、セルラーゼ酵素の濃度が約０．０１～約１０００ｐｐｍ、好ましくは約０．０２ｐｐｍ～約５００ｐｐｍ、及び最も好ましくは約０．５ｐｐｍ～約２５０ｐｐｍ合計タンパク質になるように選択される。洗剤組成物中で使用されるセルラーゼ酵素の量は、洗浄溶液を作るために水を添加することにより洗剤が希釈される程度に依存する。

【０１０５】

本発明の洗剤組成物は当業者が認識する任意の形態であり、例えば、液体、顆粒、乳液、ゲル、ペーストである。このような形態は当業者に公知である。固体洗剤組成物を使用する場合、セルラーゼは顆粒として処方するのが好ましい。好ましくは、顆粒はセルラーゼ保護剤をさらに含むように処方できる。顆粒は水媒体への顆粒の溶解速度を減少させる物質を含むように処方することもできる。このような物質及び顆粒は、その全体をここに引用する米国特許第５，２５４，２８３号に開示されている。

【０１０６】

本発明の洗剤組成物は、表面活性剤、すなわち界面活性剤、例えば洗剤組成物での使用が公知の陰イオン性、非イオン性、及び両イオン性界面活性剤を用いる。

【０１０７】

本発明の洗剤組成物での使用が適した陰イオン性界面活性剤は、直鎖または分岐鎖アルキルベンゼンスルフォネート；直鎖または分岐鎖アルキル基またはアルケニル基を有するアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩；アルキルまたはアルケニル硫酸塩；オレフィンスルフォネート；及びアルカンスルフォネートが挙げられる。陰イオン性界面活性剤に関する適当な対イオンは、アルカリ金属イオン、例えばナトリウム及びカリウム；アルカリ土類金属イオン、例えば、カルシウム及びマグネシウム；アンモニウムイオン；及び炭素数２または３の１～３のアルカノール基を有するアルカノールアミンが挙げられる。両性界面活性剤は第４級アンモニウム塩スルフォネート及びベタイン型両性界面活性剤が挙げられる。当該両性界面活性剤は同じ分子内に正及び負電荷の両方の基を有する。非イオン性界面活性剤は通常、ポリオキシアルキレンエーテル及び高脂肪酸アルカノールアミドまたはその酸化アルキレン付加、脂肪酸グリセリンモノエステル等を含むことができる。本発明での使用に適した界面活性剤は英国特許出願番号第２　０９４　８２６Ａに開示されており、その開示の内容をここに引用する。このような界面活性剤の混合物も使用することができる。界面活性剤または界面活性剤の混合物は通常、本発明の洗剤組成物におい

て合計洗剤組成物の約１重量％～約９５重量％の量、好ましくは合計洗剤組成物の約５重量％～約４５重量％で使用される。セルラーゼ組成物及び界面活性剤に加え、本発明の洗剤組成物は任意で１以上の以下の成分を含むことができる。

【０１０８】

セルラーゼ以外のヒドロラーゼ

適当なヒドロラーゼは、エステル結合上に作用するカルボキシレートエステルヒドロラーゼ、チオエステルヒドロラーゼ、ホスフェートモノエステルヒドロラーゼ、及びホスフェートジエステルヒドロラーゼ；グリコシル成分上に作用するグリコシドヒドロラーゼ；Ｎ－グリコシル成分を加水分解する酵素；エーテル結合上に作用するチオエーテルヒドロラーゼ；ペプチド結合上に作用するａ－アミノ－アシル－ペプチドヒドロラーゼ、ペプチジル－アミノ酸ヒドロラーゼ、アシル－アミノ酸ヒドロラーゼ、ジペプチドヒドロラーゼ及びペプチジル－ペプチドヒドロラーゼが挙げられる。この中で好ましいものは、カルボキシレートエステルヒドロヒドロラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、及びペプチジル－ペプチドヒドロラーゼである。適当なヒドロラーゼは、（１）ペプチジル－ペプチドヒドロラーゼに属するプロテアーゼ、例えば、ペプシン、ペプシンＢ、レンニン、トリプシン、キモトリプシンＡ、キモトリプシンＢ、エラスターゼ、エンテロキナーゼ、カテプシンＣ、パパイン、キモパパイン、フィシン、トロンビン、フィブリノリジン、レニン、スブチリシン、アスペルギロペプチダーゼＡ（ａｓｐｅｒｇｉｌｌｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ　Ａ）、コラゲナーゼ、クロストリジオペプチダーゼＢ（ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ　Ｂ）、カリクレイン、ガストリシン、カテプシンＤ、ブロメリン、ケラチナーゼ、キモトリプシンンＣ、ペプシンＣ、アスペルギロペプチダーゼＢ、ウロキナーゼ、カルボキシペプチダーゼＡ及びＢ、及びアミノペプチダーゼ；（２）グリコシドヒドロラーゼ（必須成分であるセルラーゼはこの群から除く）α－アミラーゼ、β－アミラーゼ、グルコアミラーゼ、インベルターゼ、リゾチーム、ペクチナーゼ、キチナーゼ及びデキストラナーゼを含む。この中で好ましくは、α－アミラーゼ及びβ－アミラーゼである。これらは酸から中性の系で機能するが、細菌から得られるものはアルカリ性の系において高い活性を示す；（３）カルボキシレートエステルヒドロラーゼ、例えばカルボキシルエステラーゼ、リパーゼ、ペクチンエステラーゼ、及びクロロフィラーゼなど。この中で特に効果的なものはリパーゼである。

【０１０９】

セルラーゼ以外のヒドロラーゼは本目的に従って必要とされる量だけ洗剤組成物内に組み込まれる。好ましくは、精製タンパク質に関して、０．００１～５重量％、及びより好ましくは０．０２～３重量％の量で組み込まれるべきである。この酵素は、未精製酵素だけで作られた、またはその他の成分と組合わせて、顆粒形態で洗剤組成物中で使用すべきである。未精製酵素の顆粒は、顆粒中、精製酵素が０．００１～５０重量％となるような量で使用される。当該顆粒は０．００２～２０及び好ましくは０．１～１０重量％の量で用いる。セルラーゼと同様、これらの顆粒は酵素保護剤及び分解遅延剤を含むように処方できる。

【０１１０】

陽イオン界面活性剤及び長鎖脂肪酸塩

当該陽イオン界面活性剤及び長鎖脂肪酸塩は、飽和または不飽和脂肪酸塩、アルキルまたはアルケニルエーテルカルボン酸塩、α－スルホ脂肪酸塩またはエステル、アミノ酸型界面活性剤、リン酸エステル界面活性剤、４級アンモニウム塩、例えば３～４のアルキル置換基及び１以下のフェニル置換アルキル置換基を有するものを含む。適当な陽イオン界面活性剤及び長鎖脂肪酸塩は英国特許出願番号第２　０９４　８２６Ａに開示されており、その開示の内容をここに引用する。本組成物は約１～約２０重量％の当該陽イオン界面活性剤及び長鎖脂肪酸塩を含むことができる。

【０１１１】

ビルダー

Ａ．二価金属イオン封鎖剤（ｓｅｑｕｅｓｔｅｒｉｎｇ　ａｇｅｎｔｓ）

本組成物は約０～約５０重量％の１以上のビルダー成分を含むことができ、以下の化合物のアルカリ金属塩及びアルカノールアミン塩からなる群より選択される：リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノカルボキシレート、アミノ酸塩、アミノポリアセテート高分子量電解質、非分散ポリマー、ジカルボン酸塩、及びアルミノケイ酸塩。適当な二価金属イオン封鎖剤は米国特許出願番号第２　０９４　８２６Ａに開示されており、その開示の内容をここに引用する。

【０１１２】

Ｂ．アルカリまたは無機電解質

本組成物は当該組成物に基づいて、約１～約５０重量％、好ましくは約５～約３０重量％の１以上の以下の化合物のアルカリ金属塩をアルカリまたは無機電解質として含むことができる：ケイ酸塩、炭酸塩及び硫酸塩及び有機アルカリ、例えば、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン及びトリイソプロパノールアミン。

【０１１３】

再付着防止剤

本組成物は約０．１～約５重量％の１以上の以下の化合物を再付着防止剤として含むことができる：ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、及びカルボキシメチルセルロース。

【０１１４】

この中でも、カルボキシメチル－セルロース及び／またはポリエチレングリコールと本発明のセルラーゼ組成物との組み合わせは特に有用な汚れ除去組成物を提供する。

【０１１５】

漂白剤

本発明のセルラーゼと漂白剤とを組み合わせた使用、例えば漂白剤はモノ過硫酸カリウム、過炭酸ナトリウム、過ホウ酸ナトリウム、硫酸ナトリウム／過酸化水素付加化合物及び塩化ナトリウム／過酸化水素付加化合物または／及び光過敏漂白剤、例えば、スルホン化フタロシアニンの亜鉛またはアルミニウム塩は、さらに洗剤効果を改善する。同様に、ＥＰ６８４　３０４に記載の漂白剤及び漂白触媒も用いることができる。

【０１１６】

青味剤及び蛍光染料

種々の青味剤及び蛍光染料は必要に応じて本組成物に組み込むことができる。適当な青味剤及び蛍光染料は英国特許出願第２　０９４　８２６Ａに開示されており、その開示の内容をここに引用する。

【０１１７】

凝結防止剤

以下の凝結防止剤は粉末洗剤中に組み込むことができる：ｐ－トルエンスルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、酢酸塩、スルホ琥珀酸塩、タルク、微細粉末シリカ、アモルファスシリカ、粘土、ケイ酸カルシウム（例えば、Ｊｏｈｎｓ　Ｍａｎｖｉｌｌｅ　Ｃｏ．のマイクロ－セル（Ｍｉｃｒｏ－Ｃｅｌｌ））、炭酸カルシウム及び酸化マグネシウム。

【０１１８】

酸化防止剤

酸化防止剤は、例えば、ｔｅｒｔ－ブチル－ヒドロキシトルエン、４，４’－ブチリデンビス（６－ｔｅｒｔ－ブチル－３－メチルフェノール）、２，２’－ブチリデンビス（６－ｔｅｒｔ－ブチル－４－メチルフェノール）、モノスチレン化クレゾール、ジスチレン化クレゾール、モノスチレン化フェノール、ジスチレン化フェノール及び１，１－ビス（４－ヒドロキシ－フェニル）シクロヘキサンが挙げられる。

【０１１９】

可溶化剤

可溶化剤は例えば、低級アルコール、例えば、エタノール、ベンゼンスルホン酸塩、低級アルキルベンゼンスルホン酸塩、例えば、ｐ－トルエンスルホン酸塩、グリコール、例えば、プロピレングリコール、アセチルベンゼン－スルホン酸塩、アセトアミド、ピリジ

ンジカルボン酸アミド、安息香酸塩及び尿素が挙げられる。

【０１２０】

本発明の洗剤組成物は酸性からアルカリ性ｐＨまで広いｐＨ範囲で用いることができる。好ましい実施態様において、本発明の洗剤組成物は、５以上から約１２以下のｐＨを有する弱酸性、中性またはアルカリ性洗浄媒体中で用いることができる。

【０１２１】

上記成分に加えて、香料、緩衝剤、保存料、染料等を所望により本発明の洗剤組成物と一緒に用いることができる。当該成分は従来当業界で用いられてきた量で適宜用いられる。

【０１２２】

本発明で使用される洗剤基材が粉末形態の場合、公知の調製方法、例えば噴霧乾燥法及び造粒法により調製されるものである。特に噴霧乾燥法、凝集法、乾燥混合法または非塔（ｎｏｎ－ｔｏｗｅｒ）ルート法により得られる洗剤基材は好ましい。噴霧乾燥法により得られる洗剤基材は調製条件については制限されない。噴霧乾燥法により得られる洗剤基材は、熱耐性成分、例えば表面活性剤及びビルダーの水性スラリーを温空間内に噴霧することにより得られる空洞の顆粒である。噴霧乾燥後、香料、酵素、漂白剤、無機アルカリ性ビルダーを加えることができる。噴霧乾燥造粒または凝集法などにより得られた高い密度の顆粒洗剤基材と一緒に、種々の成分も基材の調製後に加えることできる。

【０１２３】

洗剤基材が液体の場合、均質溶液または不均質分散液であってもよい。洗剤中のセルラーゼによるカルボキシメチルセルロースの分解を除去するために、カルボキシメチルセルラーゼは組成物に組み込む前に顆粒化またはコーティングされていることが望ましい。

【０１２４】

本発明の洗剤組成物はセルロース含有布、例えば、汚れた布と一緒に工業的及び家庭用途においてこれらの環境で適宜用いられる温度、反応時間及び溶液比で培養できる。

【０１２５】

本発明に従う洗剤は、十分な活性が存在し、所望の改善、軟化、毛羽取り、毛羽立ち防止、表面繊維除去、または洗浄が得られる、中性ｐＨで適当な溶液中で前洗浄としてさらに処方できる。洗剤組成物が液体、スプレー、ゲルまたはペースト組成物としての前含浸（ｐｒｅ－ｓｏａｋ）（例えば、前洗浄または前処理）組成物の場合、セルラーゼ酵素は通常、前含浸または前処理組成物の全重量に基づいて約０．０００１～約１重量％で用いられる。このような組成物において、界面活性剤を任意で用いることができ、用いる場合、通常、前含浸の全重量に基づいて、約０．００５～約２０重量％の濃度で存在する。組成物の残りは前含浸において用いられる従来成分を含み、すなわち、従来濃度での希釈剤、緩衝剤、その他の酵素（プロテアーゼ）等である。

【０１２６】

ここに記載のセルラーゼを含む組成物は、色あせた布の色修復（例えば、ここにその全体を引用する米国特許第４，７３８，６８２号を参照）及びシミ取り及び毛羽取り及び抗毛羽立ち（毛羽立ち防止）のための使用に適した単独組成物として家庭用で用いることができると考えられる。

【０１２７】

本発明に従うセルラーゼの使用は飼料添加剤及びパルプ及び紙処理において特に効果的である。これらのさらなる工業的用途については例えば、ＰＣＴ国際公開番号第９５／１６３６０号及びフィンランド発行特許第８７３７２号にそれぞれ記載されている。

【０１２８】

本発明及びその利点についてさらに説明するために、以下に具体的な実施例を与えるが、これらは本発明を説明するために提供するものであり、その範囲を限定するものとしていかなる方法においても解釈すべきでないことが理解される。

【０１２９】

実施例

以下の実施例を与えるが、本発明を限定するものではない。

【０１３０】

実施例１　サンプル収集及び処理

この実施例はｃＤＮＡライブラリーを作成するために十分なＤＮＡを得るためのサンプルの収集法及び処理法について説明する。

【０１３１】

水サンプル（２５０ｍｌ）をＳｏｎａｃｈｉ湖（クレーター）、ケニアの沿岸帯から、柔軟伸展性１－ｍ棒の先端に取り付けたステンレススチール・ビーカーを用いて収集し、室温で研究所に輸送するため密封可能なプラスティック容器（Ｗｈｉｒｌｐａｋ）内に納めた。水の表面温度は２８℃、ｐＨ１０及び伝導率は７．２３ｍＳｃｍ$^{-1}$（２７℃で）であった。

【０１３２】

微生物叢を収集するために、Ｓｏｎａｃｈｉ（クレーター）湖、ケニアからの水（７５０ｍｌ）を、減少した細孔サイズの硝酸セルロースまたは酢酸セルロースからなる一連の殺菌薄膜フィルター（直径４７ｍｍ）を通して、水流が全て止まるまで（手動吸引ポンプを用いて）現地でろ過した。一連のフィルターは８μｍ、３μｍ及び０．２２μｍであった。個々の薄膜フィルターを１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ、ｐＨ８．０；１ｍＭ　ＥＤＴＡ及び５％ｗ／ｖ　ＮａＣｌを含む３０ｍｌ殺菌プラスティック・ユニバーサル菅内の１０ｍｌの冷、殺菌細胞安定化緩衝剤（ＴＥＳ）中に速やかに加え、冷蔵された冷却ボックス内の氷上に、さらに処理するときまで、通常はサンプル採取４時間以内で保管した。フィルター上の細菌物質は、殺菌ガラスビーズ（５ｍｌ）及び微量遠心菅内で５分間、１３，０００ｇで遠心することにより沈殿した細胞を混合しながら激しくかき混ぜることにより分散させた。細菌物質を、推定で10^{8}～10^{9}の等量の細菌細胞を含む体積で微量遠心菅に等分し、合計１２個の菅を得た。ＤＮＡをＧｅｎｏｍｉｃＰｒｅｐ（登録商標）Ｃｅｌｌｓ及びＴｉｓｓｕｅ　ＤＮＡ単離キット（アマシャム・ファルマシア・バイオテック（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ニュージャージー州、米国）を用いて取扱説明書に従って抽出した。各菅中の細胞は所定の６００μｌの細胞溶解液中に再懸濁し、８０℃、５分間で培養し、細胞を溶解させた。この方法により調製したサンプルは室温で少なくとも１８ヶ月間安定であり、この形態で研究室に戻した。ＤＮＡ抽出を製造業者手順に従って、ＲＮＡアーゼ処理、タンパク質沈殿及びＤＮＡイソプロパノール沈殿により完結させた。各ＤＮＡペレットを１００μｌ殺菌Ｔｒｉｓ緩衝液１０ｍＭ　ｐＨ８．５中に溶解させた。

【０１３３】

ＤＮＡ収量は５μｌのサンプルを０．５％　ｗ／ｖアガロースゲル上で処理し、細菌性ゲノムＤＮＡの公知量と比較することにより推測した。サンプルをプールし、合計約２０μｇのＤＮＡを得た。収量が低かったので、ｏｎ－ｓｉｔｅ物質として同時に収集した水サンプルから抽出した約３０％の余分物質で物質を補充し、必要なときまで４℃で研究室で保存した。約３０μｇの量のＤＮＡは、予備実験が示した開始物質の量であり、試験及びバルク制限消化及びサイズ分画を行うために必要であり、ライブラリー構築のために十分な物質を与えた。

【０１３４】

実施例２

ライブラリー構築

以下の実施例は、大腸菌内の新規な配列のスクリーニング及び検出に使用するためのＤＮＡライブラリーをどのように調製するかについて詳述する。

【０１３５】

ＤＮＡ調製

プールしたＤＮＡをゲノムＤＮＡライブラリーの構築のために用いた。精製ＤＮＡをＳａｕ３Ａ１を用いて部分的に消化し、約５ｋｂの平均断片サイズを得た。制限ＤＮＡを電気泳動法によりＴＡＥにおいて０．５％アガロース上でサイズ分画した（０．０４Ｍ　Ｔ

ｒｉｓ－アセテート、０．００１Ｍ　ＥＤＴＡ　ｐＨ８．０）。１．５～１０ｋｂ範囲の物質を切り取り、アガロースゲルの未使用部分をカットした同じサイズのウェル中に置き換え、逆電流により狭いバンドに濃縮させた。ＤＮＡバンドを切断し、キアゲン（ＱＩＡＧＥＮ）（Ｃｒａｗｌｅｙ，ＵＫ）ＱＩＡＥＸＩＩゲル抽出キットを用いて、取扱説明書に従ってＤＮＡ抽出した。溶出ＤＮＡをエタノールを用いて沈殿させ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ緩衝液、ｐＨ８．５中に再懸濁した。

【０１３６】

ラムダライブラリーの調製

制限ＤＮＡをラムダベクター内に、ＺＡＰ－エクスプレス（登録商標）ベクターキット（ＢａｍＨ１で前消化、及びアルカリホスファターゼ処理）及びＧｉｇａｐａｋ（登録商標）ＩＩＩゴールド・パッケージング抽出（ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、アムステルダム、オランダ）を用いて製造業者手順に従いクローンした。最初のライブラリーを手順通りに、～５×１０^{4}ｐｆｕを含むアリコートを宿主大腸菌株ＸＬ１－ブルーＭＲＦ’で１５０ｍｍペトリ皿にプレートし、緩衝液中のファージを溶出させることにより増幅させた。液体窒素中で凍結させた後、増幅ライブラリーを７％　ｖ／ｖジメチルスルホキシド中、－８０℃で保存した。最初の滴定量の合計は１．８×１０^{6}ｐｆｕであり、増幅後は６．８×１０^{9}ｐｆｕ　ｍｌ$^{-1}$であった。

【０１３７】

ライブラリー特質の評価

ファージミドベクターｐＢＫ－ＣＭＶをＥｘＡｓｓｉｓｔヘルパーファージ（ストラタジーン）を用いて製造業者の説明書通りにラムダＺＡＰライブラリーから切り取り、大腸菌株ＸＬＯＬＲを感染させるために用いた。プラスミド含有クローンを５０μｇ　ｍｌ$^{-1}$カナマイシンを含むルリア栄養（ＬＢ）寒天上にプレートすることにより単離した。Ｘｇａｌ［５－ブロモ－４－クロロ－３－インドイル－β－Ｄ－ガラクトシド］及びＩＰＴＧ［イソプロピルチオ－β－Ｄ－ガラクトシド］の存在下、青白スクリーニングを用いてクローニング効率を測定した。ＤＮＡがラムダベクター内にクローンされなかった場合、β－ガラクトシド遺伝子が誘導因子ＩＰＴＧの存在下で発現され、基質類似体Ｘｇａｌの分裂を生じ、コロニー内に青色着色を生じる。しかしながら、ゲノムＤＮＡの断片がうまくラムダベクター内にクローンされた場合、遺伝子が阻害され、従って、酵素は生成されず、コロニーは白色のままである。従って、青色と白色コロニーの比は挿入を含むクローンの割合を計算するために用いることができる。このライブラリーに関して、青白スクリーニングは青７、白２８６のコロニー比を生じ、９７％のコロニーがゲノムＤＮＡ挿入を含んでいたことを示した。無作為に２４のコロニーを選択し、ＢａｍＨ１クローニング部位に隣接するＰｓｔ１及びＨｉｎｄＩＩＩを用いるＷｉｚａｒｄ（登録商標）Ｐｌｕｓ　ＳＶ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ＤＮＡ精製システム（Ｐｒｏｍｅｇａ　ＵＫ、サウサンプトン（Ｓａｕｔｈａｍｐｔｏｎ））制限分析を用い、続いてアガロースゲル電気泳動法により調製したプラスミドＤＮＡを使用して挿入サイズを測定した。２４個の中、１個のクローンは検出可能な挿入を含まなかった。残りは１．５ｋｂ～８．０ｋｂの範囲の挿入を有した。

【０１３８】

実施例３

セルラーゼのためのライブラリースクリーニング

ｐＢＫ－ＣＭＶファージミド中のＤＮＡライブラリーを大腸菌クローンのプレート分析におけるセルラーゼ活性に関して、スクリーニングした。セルラーゼ活性を検出するために、ゲノムライブラリーをカナマイシン、０．５％　ｗ／ｖカルボキシメチルセルロース（低粘度ナトリウム塩；シグマ（Ｓｉｇｍａ）、Ｐｏｏｌｅ，ＵＫ）及びＩＰＴＧ（直径７ｃｍのペトリ皿内で寒天の表面上に広げた１５μｌの０．５Ｍ溶液）を含むＬＢ寒天上にプレートした。３７℃で一晩中成長させた後、当該コロニーを水に溶かして５０℃まで冷やした３ｍｌ溶融０．７％　ｗ／ｖアガロースでかぶせた。これが終わると、当該プレートを０．１％　ｗ／ｖ　コンゴレッド（Ｃｏｎｇｏ　Ｒｅｄ）溶液で３０分間水浸しに

し、続いて１Ｍ　ＮａＣｌで２回洗浄した。細胞外セルラーゼ活性を示す陽性クローンは赤背景に対してイエロー・ハロ（ｙｅｌｌｏｗ　ｈａｌｏ）で囲まれた（Ｒ．Ｔｅａｔｈｅｒ　ａｎｄ　Ｐ．Ｊ．Ｗｏｏｄ，Ａｐｐｌｉｅｄ＆Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，４３：７７０－７８０，１９８２）。

【０１３９】

１１０，０００の大腸菌ｐＢＫ－ＣＭＶクローンのスクリーニングにより４領域のクリアリング指示潜在性（ｃｌｅａｒｉｎｇ　ｉｎｄｉｃａｔｉｎｇ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）のセルラーゼ生成コロニーを生じた。これらの３つは、除去領域（ｃｌｅａｒｅｄ　ｚｏｎｅ）から取除いた寒天プラグを均質化し、単一のコロニーの筋をつけて、コンゴレッド試験により表現型を確認した後、セルラーゼ生成クローンとしてうまく回収された。

【０１４０】

実施例４

セルラーゼ陽性クローンのキャラクタリゼーション

プラスミドＤＮＡを３つのセルラーゼ陽性クローンから単離し、挿入サイズを上述の通り制限消化により測定した。ゲル電気泳動により測定して消化後、３つ全てが同じサイズ（約３．５ｋｂ）であり、及び同じサイズの断片を有した。このことは、３つ全ての単離体が同一であり、単一のクローンの増幅により生じたことを示す。これは、プラスミドＤＮＡのシーケンシングの第１ラウンドにより確認された（ｐＢＫＣＭＶプラスミド中のプライマー部位を用いて）。これはレスター（Ｌｅｉｃｅｓｔｅｒ）大学でタンパク質及び核酸化学研究室により、パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）‘ＢｉｇＤｙｅ’ターミネーター・ケミストリー及び３７７モデルＡＢＩ自動ＤＮＡシーケンサーを用いて行われた。配列の完全な範囲が挿入の５’及び３’の両末端から‘プライマーウォーキング’により得られた。当該配列はアプライド・バイオシステムス（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）マルチ配列編集Ｓｅｑｅｄ（登録商標）バージョン１．０．３を用いて編集した。配列はレスター大学から入手可能なＧＣＧウィスコンシン（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）パッケージ、バージョン１０．２－ＵＮＩＸにおけるプログラムを用いて組み立てた。これにより４２０５ヌクレオチド塩基の環境ＤＮＡの挿入を同定した（図１）。

【０１４１】

実施例５

セルラーゼ遺伝子の同定

クローンＢａｇＣｅｌの挿入環境ＤＮＡのヌクレオチド配列における可能なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をＭａｐＤｒａｗプログラム（ＤＮＡＳＴＡＲ、Ｂｒｉｇｈｔｏｎ、マサチューセッツ州、米国）のＯＲＦ　Ｆｉｎｄ設備またはベクターＮＴＩ式（Ｓｕｉｔｅ）のプログラムからのＯＲＦサーチ（ＩｎｆｏｒＭａｘ（登録商標、Ｎｏｒｔｈ　Ｂｅｔｈｅｓｄａ，メリーランド州、米国）を用いて同定した。

【０１４２】

これにより、５７０アミノ酸のタンパク質に対応した１７１３ヌクレオチドからなるＯＲＦが同定され、挿入配列の位置１５３２から開始して位置３２４４で終わった。このＯＲＦの配列はＥｄｉｔＳｅｑ（ＤＮＡＳＴＡＲ）を用いて切り取り、ＢＬＡＳＴプログラムにより測定した。

【０１４３】

このＯＲＦのヌクレオチド配列を図２に示す。

【０１４４】

ＢＬＡＳＴｎプログラムを用いたヌクレオチド配列の調査は、重複のないヌクレオチド配列データベースに対してヌクレオチド質問配列を比較するものであり、公知配列に対してバチルス・ハロデュランス（ｈａｌｏｄｕｒａｎｓ）ゲノムの一部と同一性を示した。

【０１４５】

ＢＬＡＳＴｘプログラムを用いるヌクレオチド配列の調査は、ヌクレオチド質問配列（両ストランド）の６フレーム概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースに対して比較するものであり、多数の細菌性エンドセルラーゼに著しい類似性を示した。最も高い配列

スコアは、５７４アミノ酸を含む酵素であり、通性好アルカリ性（ｆａｃｕｌｔａｔｉｖｅ　ａｌｋａｌｉｐｈｉｌｉｃ）細菌バチルス・ハロデュランス株Ｃ１２５（タンパク質ＩＤ　ＢＡＢ０４３２２、アクセッション　ＡＰ００１５０９）のエンド－β－グルカナーゼ（セルラーゼＢ）の１５４アミノ酸領域に対して６６％同一性（１０３アミノ酸）を示した。この新しい同定遺伝子はバチルス・ハロデュランスセルラーゼに６６％同一性を有する５７０アミノ酸のタンパク質をコードした。

【０１４６】

５７０個のアミノ酸からなる翻訳タンパク質を図３に示す。

【０１４７】

実施例６

酵素キャラクタリゼーション

塩の影響

ＢａｇＣｅｌ遺伝子を含む大腸菌ｐＢＫ－ＣＭＶ細胞を５ｍｌ緩衝液（２０ｍＭ　ＴＲＩＳ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０；５００ｍＭ　ＮａＣｌ；０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ；０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）中に懸濁し、氷上で超音波処理することにより分解させる。超音波分解した抽出物をカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）上で寒天拡散分析により、種々のＮａＣｌ濃度で調べる。超音波分解抽出物（１００μＬ）及び１０個中１個の希釈物を種々の量のＮａＣｌを含むＣＭＣ－寒天プレート中に穴を開けたウェル内に配置する。当該プレートを３７℃、１６時間で培養し、セルロース加水分解を示す生じた除去（ｃｌｅａｒｉｎｇ）領域をミリメーターで測定する。セルラーゼＢａｇＣｅｌは０～２５％ｗ／ｖ　ＮａＣｌの範囲で活性だが、２５％ｗ／ｖ　ＮａＣｌでの活性は０％　ＮａＣｌでの活性の約５０％しかない。

【０１４８】

ｐＨの影響

セルラーゼ活性におけるｐＨの影響をＧｒａｎｔ＆Ｔｉｎｄａｌｌ（Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｌｋａｌｉｐｈｉｌｉｃ　ｂａｃｔｅｒｉａ（アルカリ性細菌の単離），Ｉｎ：Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｇｒｏｗｔｈ　ａｎｄ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ　ｉｎ　Ｅｘｔｒｅｍｅ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，ロンドン、１９８０、第２７～３６頁）に記載のｐＨ勾配プレート法を用いて調査する。ＣＭＣを含む寒天培地を四角形ペトリ皿の深さ１ｃｍまで注ぎ、設置する。幅１ｃｍの均一な鉢をプレートの端から切り取り、２０％ｗ／ｖ Na_2CO_3・$10H_2O$及び０．２Ｍ　ＮａＯＨを含む寒天（同体積の殺菌０．４Ｍ　ＮａＯＨ／４０％ｗ／ｖ Na_2CO_3・$10H_2O$及び４％ｗ／ｖ寒天を６０℃で混合することにより調製したもの）を鉢の中に注ぐ。当該プレートを３７℃で一晩中成長させ、均一にｐＨ１２～ｐＨ７勾配を形成させる。ＢａｇＣｅｌセルラーゼのｐＨ耐性を調べるために、鉢を狭く（寒天）勾配により元の鉢に対して直角に切り取り、１ｍｌの超音波分解した細胞抽出物で満たす。当該プレートを３７℃で一晩中成長させた。当該プレートをコンゴレッドで３０分間処理し、セルロース加水分解の領域を視覚化する。ＢａｇＣｅｌセルラーゼは約ｐＨ１１．５まで活性である。

【０１４９】

ここに記載される実施例及び実施態様は説明目的のためのみであり、これに照らして種々の修正または変形が当業者に示唆され、本発明の概念及び精神及び請求の範囲の範囲内であることが理解される。ここに記載の全ての文献、特許及び特許出願はその全体を全ての目的においてここに引用するものとする。

【図面の簡単な説明】

【０１５０】

【図１Ａ】図１は環境（ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ）ヌクレオチド配列（配列番号１）を示す。

【図１Ｂ】図１は環境（ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ）ヌクレオチド配列（配列番号１）を示す。

【図２】図２は新規なセルラーゼをエンコードする核酸配列を示す（配列番号２）。

【図３】図３は本発明のセルラーゼの推定アミノ酸配列を示す（配列番号３）。

Figure 1A **Nucleotide sequence of inserted environmental DNA**

```
TCTCATTTAG TTTGACTGAA ATACCTACTG TGCCACAAAG TAAAGTTAAA          50
CTGACGAATG TGGAACGAAT CACTTAATGG TTCTAGCATA GATAACGAAA         100
GATGAACACG TTCAAAGTTC GCCACTCTTT TGAAAGAGGG TGAACTTTTT         150
TTGTGACAAG AAAGGGTGTT AAATGAAGAT CAAAGCTAAA CAAGATGAGT         200
AACGTTTCTT TTCTTTTTTA TAGAGTGAGT TAGTATATGA GTCCCTTATA         250
AATTTCTAGA CTGTTATTTT AAATAATTGA ATGACTCAGT CACCATTAAG         300
TTTTCAACAC CCATAAGCGA CGTTTGAAGA TCTAATGATG CGAGAGGTTT         350
TATCACTTTG GAGCGGAAGA TCACTGTAGG ACTCGTTTTA TATGGTGAAC         400
TTGGTGTTAT TGTGTATTTA AAAGAAAGGG AAACGAAAAA AATGGTTAAA         450
TTAGAAAGAG GCTATTACAG AGAGGAGAAC AAACAATGAA CGTAACACTT         500
GAAGTGACAT ACTGCACGAC TAAAGGTATT CGAACAACCT TTCATTCAGA         550
AGGTATGGAG GCCGAAAAAG CAATTACCAT CGCAGAAGAT TTTCAGCGGA         600
CAGGACGGAT AAAACAGATC GTCTTTAGAG ATGAGCGTGA TAGTCCGTGG         650
ACGTTAAAAG AACTTAAAAG ATTTTTAGAA GAGATTAAAA CGGAGCCGCA         700
TCATCTCTCT GTGTATTTTG ATGGGGGATT TGATTTGGAG ACACAACGAT         750
CTGGTCTTGG GTGTGATTTA TTATGAACAA AATGACACGT CTTATCGGGT         800
GAGAAGAAAC GCTACCGTGG CGTCATTGAC ATCGAATAAC GAAGCAGAAT         850
ATGCCGCTTT ACATTTAGGA CTTAAAGAAC TTGAAGGGAT CGGTGCGCAT         900
CATCTACCTA TCACTATTTA CGGTGATTCT CAAGTTGTGA TCAATCAGTT         950
AAAAGGAGAA TGGGCGTGTA TGGAGGAGGT GTTAAATAAA TGGGCTGACC        1000
GTATTGATCA GCATTTAGCT AAATTAGGCA TGACCGCTAC TTATAAGTTA        1050
ATCCCCCGTA AAGAAAACCG TGAAGCAGAT CAACTGGCTA CACAAGCGTT        1100
AAACGGGCAA GAAATTATAA GTCAACGTGA TGTCAGTGAG CGTGGTGCAG        1150
ATTAGTCTGC ACCCGCATAA AAGTTAACGT ATATAGAAGT GGATGGGGAT        1200
TAAAGGAACG TCATTCACTC TAAGCAAGCG TTGCGACAGC AAAAAAGAAA        1250
CATATAAGGT TTTTCTGAGC TACTATCTAT ACAAATAGCC AAGTGGCAGT        1300
TAAGCTCTTA CCTCATCAAG TTTTTGACTA CCAGTCTTCC ACTCCTACTT        1350
TCACCTATAT AAATTGGTTC CTTTTTTGTT AATAATCACT AATTTTGACG        1400
GTATTTTTTA ATAGAAATAT ATGCTAGATT ATAAACTAGT AACGATGTAG        1450
AAGGTGGTGA TTGACCATAT AAGAAGACTC TTTCAAACCT GGTAGTATCG        1500
CATTAAAAAA TTTGAAAGGT GGAGAGGACA CATGGGTTAT ACCAAAGCGA        1550
AGTGTACGTT GAAAAAAACT GTCTTGTTTG GTTTAATTCT CTGTTTAAGT        1600
GTGTCAATGT TTGTTCCAAT GACATCAGCT GAAGATGTCA CTTCGTCACA        1650
GTTGGATATT CACTCCTATG TAGCTGACAT GCAGCCTGGC TGGAATTTAG        1700
GAAATACGTT TGACGCTGTT GGAGATGATG AAACAGCGTG GGGGAATCCT        1750
CGTGTAACAA GAGAGTTAAT AAAAACGATT GCTGATGAAG GGTATAAAAG        1800
CATTCGTATC CCAGTGACAT GGCAAAATCA AATGGGTGGT TCTCCAGATT        1850
ATACGATAAA TGAAGATTAT ATCAATCGGG TGGAGCAAGC GATAGATTGG        1900
GCGTTGGAGG AAGACTTATA TGTGATGTTA AATGTGCATC ATGACTCATG        1950
GCTGTGGATG TATGATATGG AACATAACTA TGATGAGGTC ATGGCAAGAT        2000
ATACAGCTAT TTGGGAACAA TTGTCGGAAA AATTCAAAAG CCACTCCCAT        2050
AAGTTGATGT TTGAGAGTGT CAATGAGCCT AGGTTTACGC AGGAGTGGGG        2100
AGAGATTCAA GAAAATCATC ATGCTTACTT AGAAGATTTA AATAAGACGT        2150
TCTATTATAT TGTCAGAGAG TCAGGAGGCA ATAATGTGGA GCGCCCTTTA        2200
GTATTGCCTA CGATAGAAAC AGCCACGTCT CAGGATTTAC TAGATCGCTT        2250
GTATCAAACA ATGGAAGACT TGGATGATCC TTATTTAATT GCCACGGTGC        2300
ATTATTATGG CTTCTGGCCA TTTAGTGTCA ATATAGCAGG GTACACTCAT        2350
TTTGAACAGG AAACACAACA AGATATTATA GACACCTTTG ACCGTGTTCA        2400
TAACACATTT ACAGCGCGTG GTGTCCCAGT TGTATTAGGC GAATTCGGTT        2450
```

Figure 1B

```
TGTTAGGCTT TGACAAAAGT ACGGATGTGA TTCAGCAAGG GGAGAAATTA        2500
AAGTTTTTTG AGTTTCTCAT CCATCATCTC AATGAACGTG ATATAACCCA        2550
TATGTTATGG GATAACGGCC AGCATTTAAA TCGAGAAACT TATGCATGGT        2600
ATGATCAAGA ATTTCATGAC ATATTAAAAG CGAGTTGGGA GGGGCGTTCT        2650
GCTACAGCAG AGTCTAATTT GATTCATGTG AAGGACGGAA AGCCAATTAG        2700
AGATCAAGAT ATACAGCTTT ACTTAAACGG AAATGAGCTA ACAGCCTTAC        2750
AGGCAGGGGA GGAATCGCTT GTTCTAGGAG AGGATTATGA ACTAGCAGGA        2800
GGCGTATTAA CGCTAAAAGC GGACACCCTC ACAAGACTAA TTACCCCTGG        2850
TCAATTAGGA ACCAATGCAG TCATCACAGC ACAATTTAAT TCTGGAGCAG        2900
ACTGGCGTTT TCAATTACAG AATGTGGACG TGCCAACGGT CGAAAATACA        2950
GATGGCTCAA CATGGCATTT TGCGATCCCT ACCCATTTTA ATGGTGATAG        3000
TCTTGCGACG ATGGAAGCTG TTTATGCAAA CGGAGAATAT GCTGGGCCGC        3050
AAGATTGGAC GTCATTTAAA GAATTTGGCG AGGCGTTTTC TCCTAATTAC        3100
GCCACAGGGG AAATTATTAT ATCAGAAGCC TTCTTTAACG CGGTACGGGA        3150
TGATGATATC CATTTAACAT TTCATTTTTG GAGCGGAGAG ACGGTGGAAT        3200
ATACCTTACG TAAAAATGGC AATTATGTTC AAGGTAGACG GTAACATGAT        3250
TTTAATTAAT AGATAAACCA GCCTACCTAT CGTTTTTGGA AGAAGGCAAA        3300
CGAATCTCAT CTTACCAACA CCGTGCTTTA GAACTTTAGA AGTGACGGTG        3350
TTTTTTAAGA CATGAGGAGA AGCAATCCTC TATCAACAGT CACCAATTTT        3400
TATTCAGGAG GTGTCAAGTT ATCTAACGTT CTATGAATGC ATATAGTCTC        3450
TGACGAATAA ACATAGTTAA AAAGAAGTGA GCCTAGTCCC CGAGGGGAAG        3500
GGGATAATGC CAACGTATTG GATTAAAGTA CCTTCTTGAT AAAAAGAAAG        3550
GGTTTTCAAG AGATGGAAAT GGGCTCGTTT GTTATACTTT AATTACGCCT        3600
TGGAACGTCA TTTTGGCGGT GCTATTTAGT AAGATGGCTG ACATCATAAA        3650
AGAGGAGTGG GTTCGATGGC TTTAATTCAA TTAAGCTTTA AATCACGAGC        3700
ATTAATGTTG CAAACCTCTG TCAATGTTTT ATTACCGGTG GGAATGAATG        3750
CTGTAGATTT TACACCAAGT GATGATTTTT CTTATGTTAC TGACCCTTTT        3800
CCTGTCCTAT ATCTTTTGCA TGGTGCAACT GATGATTATT CAGCATGGCT        3850
ACGTCTGTCC TCTATTGAAC GATATGCTGA AGAAAAAAAA TTGGCGGTCG        3900
TCATGCCAAA TGCTGATATG AGTGCGTATA CGGATATGGT ACATGGCCAT        3950
CGTTACTGGA CGTATATTAG TAAGGTGCTG CCTGAGTTTA TGAGAGCAAC        4000
TTTTCCTATT TCTCAGCACC GTGAAGACAC CTTTGCAGCT GGTCTGTCTA        4050
TGGGAGGATA CGGGGCTTTT AAATTGGCGC TGCGGCAACC GGAACGCTTC        4100
GCTGCAGCTG TGTCATTATC TGGTGCAGTT GATATGAGAG AAGCAAGTCA        4150
ACCAGACTCC CTATTTGTAA ATGCCTTTGG TGAAGGGACG AAAATCGCAG        4200
GGACA                                                        4205
```

【図２】

Figure 2 **ORF Nucleotide sequence of cellulase gene**

```
ATGGGTTATA CCAAAGCGAA GTGTACGTTG AAAAAAACTG TCTTGTTTGG        50
TTTAATTCTC TGTTTAAGTG TGTCAATGTT TGTTCCAATG ACATCAGCTG       100
AAGATGTCAC TTCGTCACAG TTGGATATTC ACTCCTATGT AGCTGACATG       150
CAGCCTGGCT GGAATTTAGG AAATACGTTT GACGCTGTTG GAGATGATGA       200
AACAGCGTGG GGGAATCCTC GTGTAACAAG AGAGTTAATA AAAACGATTG       250
CTGATGAAGG GTATAAAAGC ATTCGTATCC CAGTGACATG GCAAAATCAA       300
ATGGGTGGTT CTCCAGATTA TACGATAAAT GAAGATTATA TCAATCGGGT       350
GGAGCAAGCG ATAGATTGGG CGTTGGAGGA AGACTTATAT GTGATGTTAA       400
ATGTGCATCA TGACTCATGG CTGTGGATGT ATGATATGGA ACATAACTAT       450
GATGAGGTCA TGGCAAGATA TACAGCTATT TGGGAACAAT TGTCGGAAAA       500
ATTCAAAAGC CACTCCCATA AGTTGATGTT TGAGAGTGTC AATGAGCCTA       550
GGTTTACGCA GGAGTGGGGA GAGATTCAAG AAAATCATCA TGCTTACTTA       600
GAAGATTTAA ATAAGACGTT CTATTATATT GTCAGAGAGT CAGGAGGCAA       650
TAATGTGGAG CGCCCTTTAG TATTGCCTAC GATAGAAACA GCCACGTCTC       700
AGGATTTACT AGATCGCTTG TATCAAACAA TGGAAGACTT GGATGATCCT       750
TATTTAATTG CCACGGTGCA TTATTATGGC TTCTGGCCAT TTAGTGTCAA       800
TATAGCAGGG TACACTCATT TTGAACAGGA AACACAACAA GATATTATAG       850
ACACCTTTGA CCGTGTTCAT AACACATTTA CAGCGCGTGG TGTCCCAGTT       900
GTATTAGGCG AATTCGGTTT GTTAGGCTTT GACAAAAGTA CGGATGTGAT       950
TCAGCAAGGG GAGAAATTAA AGTTTTTTGA GTTTCTCATC CATCATCTCA      1000
ATGAACGTGA TATAACCCAT ATGTTATGGG ATAACGGCCA GCATTTAAAT      1050
CGAGAAACTT ATGCATGGTA TGATCAAGAA TTTCATGACA TATTAAAAGC      1100
GAGTTGGGAG GGGCGTTCTG CTACAGCAGA GTCTAATTTG ATTCATGTGA      1150
AGGACGGAAA GCCAATTAGA GATCAAGATA TACAGCTTTA CTTAAACGGA      1200
AATGAGCTAA CAGCCTTACA GGCAGGGGAG GAATCGCTTG TTCTAGGAGA      1250
GGATTATGAA CTAGCAGGAG GCGTATTAAC GCTAAAAGCG GACACCCTCA      1300
CAAGACTAAT TACCCCTGGT CAATTAGGAA CCAATGCAGT CATCACAGCA      1350
CAATTTAATT CTGGAGCAGA CTGGCGTTTT CAATTACAGA ATGTGGACGT      1400
GCCAACGGTC GAAAATACAG ATGGCTCAAC ATGGCATTTT GCGATCCCTA      1450
CCCATTTTAA TGGTGATAGT CTTGCGACGA TGGAAGCTGT TTATGCAAAC      1500
GGAGAATATG CTGGGCCGCA AGATTGGACG TCATTTAAAG AATTTGGCGA      1550
GGCGTTTTCT CCTAATTACG CCACAGGGGA AATTATTATA TCAGAAGCCT      1600
TCTTTAACGC GGTACGGGAT GATGATATCC ATTTAACATT TCATTTTTGG      1650
AGCGGAGAGA CGGTGGAATA TACCTTACGT AAAAATGGCA ATTATGTTCA      1700
AGGTAGACGG TAA                                             1713
```

【図３】

Figure 3 **Amino acid sequence of BagCel cellulase**

```
MGYTKAKCTL KKTVLFGLIL CLSVSMFVPM TSAEDVTSSQ LDIHSYVADM        50
QPGWNLGNTF DAVGDDETAW GNPRVTRELI KTIADEGYKS IRIPVTWQNQ       100
MGGSPDYTIN EDYINRVEQA IDWALEEDLY VMLNVHHDSW LWMYDMEHNY       150
DEVMARYTAI WEQLSEKFKS HSHKLMFESV NEPRFTQEWG EIQENHHAYL       200
EDLNKTFYYI VRESGGNNVE RPLVLPTIET ATSQDLLDRL YQTMEDLDDP       250
YLIATVHYYG FWPFSVNIAG YTHFEQETQQ DIIDTFDRVH NTFTARGVPV       300
VLGEFGLLGF DKSTDVIQQG EKLKFFEFLI HHLNERDITH MLWDNGQHLN       350
RETYAWYDQE FHDILKASWE GRSATAESNL IHVKDGKPIR DQDIQLYLNG       400
NELTALQAGE ESLVLGEDYE LAGGVLTLKA DTLTRLITPG QLGTNAVITA       450
QFNSGADWRF QLQNVDVPTV ENTDGSTWHF AIPTHFNGDS LATMEAVYAN       500
GEYAGPQDWT SFKEFGEAFS PNYATGEIII SEAFFNAVRD DDIHLTFHFW       550
SGETVEYTLR KNGNYVQGRR                                        570
```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***9/42***	***(2006.01)***	C12N	9/42		4B065
C12P	***7/08***	***(2006.01)***	C12P	7/08		4H003
C12P	***19/00***	***(2006.01)***	C12P	19/00		
C12Q	***1/68***	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	
C11D	***3/386***	***(2006.01)***	C11D	3/386		
C11D	***7/42***	***(2006.01)***	C11D	7/42		
C11D	***3/26***	***(2006.01)***	C11D	3/26		
C11D	***7/32***	***(2006.01)***	C11D	7/32		
A23K	***1/165***	***(2006.01)***	A23K	1/165	C	
C12S	*3/02*	*(2006.01)*	C12S	3/02		
C12R	*1/07*	*(2006.01)*	C12N	9/42		
			C12R	1:07		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＵＮＩＸ

(74)代理人 100120145
弁理士 田坂 一朗
(74)代理人 100122839
弁理士 星 貴子
(74)代理人 100133547
弁理士 木戸 基文
(72)発明者 ジョーンズ、ブライアン・イー
オランダ国、エヌエル－２２６３・ヴイエー・リードシェンダム、グレイヴィン・ユリアナ・バン・ストルバーグラーン ２４
(72)発明者 グラント、ウィリアム・ディー
英国、エルイー８・０ピーユー、レスタシャー、キブウォス・ビーチャム、ザ・ティシングス １５
(72)発明者 ヒーフィー、ショーン
英国、エルイー５・２ディーピー、レスタシャー、レスター、アッピンガム・ロード ４２６
(72)発明者 グラント、スーザン
英国、エルイー８・０ピーユー、レスタシャー、キブウォス・ビーチャム、ザ・ティシングス １５

Ｆターム(参考) 2B150 AC02 AC31 DF14
4B024 AA03 AA05 AA11 BA12 CA04 DA06 DA07 DA08 DA11 DA12
EA04 HA14
4B050 CC03 DD03
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ44 QR32 QR43 QR66 QR75 QR80 QS36
QX01
4B064 AF02 AF04 AF11 CA21 CC24 DA10 DA16 DA19 DA20

4B065 AA15X AA26X AA50X AA70Y AA72X AB01 AC14 BA02 BB18 BC03
BD18 CA31 CA41 CA55 CA57 CA60
4H003 EC03